

Sami Orpana

# Nestekromatografia-massaspektrometrinen analyysimenetelmän kehitys lyhytketjuisille karboksyylihapoille vesi- ja bioöljypohjaisista näytteistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

19.12.2014

Kiitokset Neste Oilin Tutkimusanalytiikan ryhmälle opinnäytetyön mahdollistamisesta. Erityiskiitos Tutkimusanalytiikan tutkijalle Jyrki Viidanojalle sekä yliopettaja Jukka Niirasselle. Haluan myös kiittää Raija Kekkiä avusta ja neuvoista laboratorion puolella sekä vaimoani loputtomasta tuesta.

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Sami Orpana Nestekromatografia-massaspektrometrinen analyysimenetelmän kehitys lyhytketjuisille karboksyylihapoille vesi- ja bioöljypohjaisista näytteistä</p> <p>40 sivua + 7 liitettä 19.12.2014</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioalan koulutusohjelma</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Tutkija Jyrki Viidanoja, Neste Oil Yliopettaja Jukka Niiranen, Metropolia AMK</p>
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Neste Oilin Tutkimus- ja kehitysosaston Kemia-osastolla Tutkimusanalytiikka-ryhmässä Porvoon jalostamossa. Työn tavoitteena oli kehittää LC-MS-analyysimenetelmä lyhytketjuisille karboksyylihapoille vesi- ja bioöljypohjaisista näytteistä.</p> <p>Menetelmän kehityksessä käytettiin Shimadzun LCMS-2020-laitteistoa. Yhdisteiden erottamisessa käytettiin ioniekskluusiokromatografiaa ja analysoinnissa nestekromatografian ja massaspektrometrin kombinaatiota. Sähkösumutuksella ionisoitiin analyytit käyttäen negatiivi-ionisaatiomoodia. Näytteiden puhtauden arvioinnissa käytettiin nestekromatografian diodirividetektoria ja kvantitoinnissa massaspektrometrin detektointia. Kvantitointi perustui isotooppileimausmassaspektrometriaan. Kalibroinnissa sovellettiin kiinteää kalibroitua ja kalibroitamiseksi tehtiin toisen asteen sovitus.</p> <p>Menetelmän kehityksessä optimoitiin ajo-olosuhteet ja näytteen esikäsittely. Menetelmän toimivuutta testattiin ja se todennettiin validoinnilla. Näyteajojen yhteydessä ajettiin referenssinäyte, jolla kalibroinnin pätevyys varmistettiin.</p> <p>Menetelmän kehityksen tuloksena saatiin poikkeuksellisen selektiivinen menetelmä yksinkertaisella näytteenkäsittelyllä. Menetelmää sovelletaan rutiininomaisesti Neste Oilin tutkimusanalytiikassa.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>HPLC-MS, menetelmän kehitys, lyhytketjuiset karboksyylihapot, ioniekskluusio, sähkösumus-ionisaatio</p>

Author Title	Sami Orpana Liquid chromatography - mass spectrometry method development for short chain carboxylic acids from aqueous and bio-oil based samples
Number of Pages Date	40 pages + 7 appendices 19 December 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Science
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jyrki Viidanoja, Research Scientist (Associate) Jukka Niiranen, Principal Lecturer
<p>This thesis project was carried out in the Research Analytics Team at the Chemistry Department of Neste Oil Research and Development in Porvoo, Finland. The purpose of the project was to develop a LC-MS method for the determination of short chain carboxylic acids in aqueous and bio-oil based samples.</p> <p>Shimadzu LCMS-2020 instrument was used for the development of the analytical method. Compounds were separated using ion exclusion chromatography and analyzed with Liquid Chromatograph and Mass Spectrometry (LC-MS). Ionization of the analytes was conducted by Electrospray Ionization (ESI) using negative ion mode. Diode-array detector was used to evaluate the complexity of the sample matrix. Mass spectrometric detection was used for the quantitation of the analytes. Quantitativity of the method was based on the application of stable isotope labelled internal standards. Fixed quadratic calibration was used as the calibration method.</p> <p>The LC-MS analytic method was developed by optimizing acquisition parameters and sample preparation. The method operability was tested and established with a method validation. Reference sample was run on daily basis to verify the method performance and the validity of the calibration.</p> <p>Development of the method produced a selective method with a simple sample preparation. The method is applied in everyday procedures in Research analytics at Neste Oil.</p>	
Keywords	HPLC-MS, method development, short chain carboxylic acids, ion exclusion, electrospray ionization

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	1
2.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	1
2.1.1	Ioniekskluusiokromatografia	2
2.1.2	HILIC	3
2.1.3	Diodirividetektori	3
2.2	Massaspektrometria	3
2.2.1	Kvadrupolianalysaattori	4
2.2.2	Sähkösumutusionisointi	5
2.2.3	Detektointi	5
2.3	Kalibrointi sisäisen standardin menetelmällä	6
2.4	Kiinteäfaasiuutto	7
2.5	Karboksylihapot	8
2.6	Validointi	8
2.6.1	Analyyttien valinta	8
2.6.2	Toistettavuus ja uusittavuus	10
2.6.3	Oikeellisuus	10
2.6.4	Määrittäysraja	12
2.7	Näytematriisit	12
3	Kemikaalit ja laitteisto	13
3.1	Käytetyt reagenssit	13
3.2	Sisäiset standardit	14
3.3	Laitteet	14
3.3.1	Nestekromatografi	15
3.3.2	Massaspektrometri	15
4	Työn suoritus	16
4.1	Laitteen säätäminen karboksylihapoille	16
4.2	Retentioaikojen selvittäminen	17
4.3	Ajoliuoksen testaaminen	18

4.4	Karboksyylihappoliuosten valmistus	18
4.4.1	Kantaliuosten valmistus	18
4.4.2	Analyyttien työliuoksen valmistus	19
4.4.3	Sisäisten standardiliuosten valmistus	19
4.5	Näytteiden käsittely	20
4.5.1	Neste-nesteuutto	20
4.5.2	Kiinteäfaasiuutto	22
4.5.3	Vesipohjaisten näytteiden esikäsittely	23
4.6	Emäksen vaikutus ionisaatioon	24
4.7	Koronaneulan vaikutus	24
4.8	Kalibrointi	24
5	Menetelmän kehityksen testien tulokset	25
5.1	Ajoliuostestien tulokset	27
5.2	Kantaliuosten valmistus	28
5.3	Sisäisten standariden valmistus	29
5.4	Öljypohjaisten näytteiden neste-nesteuutto	30
5.5	Vesipohjaisten näytteiden esikäsittely	32
5.6	Kiinteäfaasiuutto	33
5.7	Emäksen vaikutus ionisaatioon	34
5.8	Kalibrointi	34
5.9	Integrointi	34
6	Validoinnin tulokset	34
6.1	Toistettavuus ja sisäinen uusittavuus	35
6.2	Oikeellisuus	36
6.3	Kalibroinnin tarkkuus	36
6.4	Määrittäysraja	36
7	Loppupäätelmät	37
	Lähteet	39
	Liitteet	
	Liite 1. Kiinteäfaasiuuton testien vaiheet	
	Liite 2. Neste-nesteuuton testien vaiheet	
	Liite 3. Toistettavuus	
	Liite 4. Sisäinen uusittavuus luottamustasolla 95 %	
	Liite 5. Oikeellisuus	

Liite 6. Kalibrointikuvaajat

Liite 7. Kalibroinnin tarkkuus

## Lyhenteet

ACN	<i>Acetonitrile</i> , asetoniiri.
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> , ilmanpaineinen kemiallinen ionisaatio, ionisaatio koronaneulan avulla.
DUIS	<i>Dual Ion Source</i> , kaksois-ionisaatiolähde, ionisaatio koronaneulan (APCI) ja sähkösumutuksen (ESI) avulla.
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , sähkösumutusionisaatio.
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i> , hydrofiilinen vuorovaikutus -kromatografia.
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
HPLC-MS	<i>High performance liquid chromatography – mass spectrometry</i> , nestekromatografia-massaspektrometria.
IEC	<i>Ion Exclusion Chromatography</i> , ioniekskluusiokromatografia.
ISTD	<i>Internal Standard</i> , sisäinen standardi.
m/z	<i>Mass to Charge Ratio</i> , massa-varaussuhde.
NExBTL	<i>Next Generation Biomass to Liquid</i> , Neste Oilin kehittämä biodiesel.
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> , suhteellinen keskihajonta.
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , kiinteäfaasiuutto.
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> , trifluorietikkahappo.



## 1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Neste Oilin Tutkimus- ja kehitysosaston Kemia-osastolla Tutkimusanalytiikka-ryhmässä. Tarkoituksena oli kehittää HPLC-MS (nestekromatografia -massaspektrometria) analyysimenetelmä karboksyylihapoille vesi- ja bioöljypohjaisista näytteistä. Yrityksessä opinnäytetyön ohjaajana ja menetelmän kehityksen vastaavana tutkijana toimi Jyrki Viidanoja. Opinnäytetyöhön kuului näytteiden esikäsittely, kiinteäfaasiuuton testaus, ajoliuoksen optimointi, laitteen huoltotoimenpiteet ja validointi. Testien tuloksia tarkasteltiin jokaisen testin jälkeen ja niiden perusteella päätetyt jatkotoimenpiteet menetelmän kehityksessä tehtiin vastaavan tutkijan johdolla. Opinnäytetyö suoritettiin Neste Oilin Porvoon jalostamossa, Teknologiakeskuksen tutkimusanalytiikan nestekromatografialaboratoriossa.

Neste Oil on jalostus- ja markkinointiyhtiö, joka on keskittynyt korkealaatuisiin puh- taamman liikenteen polttoaineisiin. Yhtiö on maailman johtava uusiutuvista raaka- aineista valmistetun dieselin toimittaja, ja se valmistaa kaikkia tärkeimpiä öljytuotteita. [1.] Porvoossa Tutkimus- ja teknologiatoiminnassa työskentelee lähes 1000 työnteki- jää. Tutkimus- ja kehitysosaston investoinneista noin 70 % suuntautuu uusiutuvien raa- ka-aineiden tutkimukseen. Neste Oilin NExBTL-diesel onkin maailman puhtainta uusiu- tuvista raaka-ainesta valmistettua dieseliä. Neste Oil ja amerikkalainen Jacobs En- gineering Group omistavat asiantuntijapalveluita tarjoavan Neste Jacobsin. Neste Oilin osuus Neste Jacobsista on 60 %. Yritys tuottaa asiantuntijapalveluita öljy- ja kaasuteol- lisuuden, petrokemian ja kemianteollisuuden sekä biotekniikan alan yrityksille. [2.]

## 2 Teoria

### 2.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

HPLC (high performance liquid chromatography) eli korkean erotuskyvyn nestekroma- tografia on analyysitekniikka sekä epäorgaanisille että orgaanisille yhdisteille. Neste- kromatografialla voidaan analysoida suurikokoisia orgaanisia molekyylejä, kuten prote- iineja, aminohappoja, lipidejä tai muita suurikokoisia biologisia molekyylejä. Monen aineen samanaikainen analysointi on myös mahdollista. Nestekromatografiassa tutkit- tavan näytteen edellytys on liukeneminen liuottimeen. Tämän takia määritettävä yhdis-

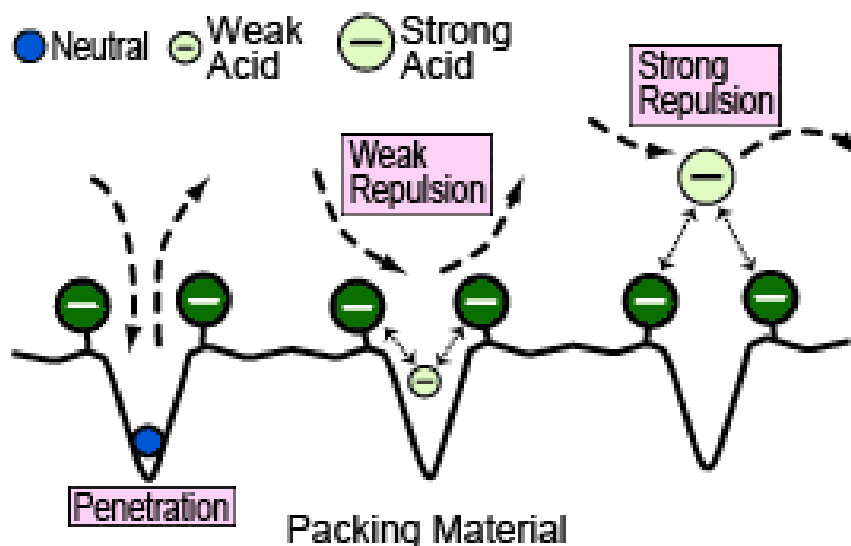
tejoukko on hyvin suuri. Nestekromatografia kostuu injektorista, pumpusta, kolonnista ja kapillaareista. Kolonni ja detektori on mahdollista termostoida. [3, s.153.]

Nestekromatografiassa pieni näytemäärä syötetään injektorin kautta liikkuvaan neste-faasiin. Nestefaasi liikkuu korkean paineen alaisena kapeissa kapillaareissa. Eluentin mukana kulkeva näyte mene kolonniin, joka on täytetty stationäärifaasilla. Stationäärifaasi koostuu pienikokoista partikkeleista, joiden avulla yhdisteiden erottuminen tapahtuu. Mitä pienempiä partikkeleita käytetään, jolloin pinta-aktiivinen pinta-ala on suuri, sitä tehokkaampaa yhdisteiden erottuminen on. Eluentin täytyy pystyä kulkemaan tasaisena virtana pakatun kolonnin läpi, jolloin pumppujen tulee pumpata korkean paineen alaisena. Pumppauksen täytyy olla sykkeetöntä, jotta virtaus pysyy tasaisena. Näytteen jakaantuminen komponenteiksi tapahtuu kolonnissa ja jakaantuneet yhdisteet tasapainottelevat liikkuvan faasin ja stationäärifaasin välillä. Mitä enemmän yhdisteen tasapaino on stationäärifaasin puolella, sitä myöhemmin se saapuu detektorille. Detektori mittaa yhdisteen antamaa signaalia ajan funktiona. [3, s.154.]

### 2.1.1 Ioniekskluusiokromatografia

Ioniekskluusiokromatografiassa (Ion Exclusion Chromatography) erottelu tapahtuu sähköisten voimien avulla, ionien koon mukaan ja liukoisuudella liikkuvaan faasiin. Stationäärifaasissa olevan varauksen takia samanmerkkiset ionit eivät pidäty, vaan eluoi-tuvat ensimmäisinä. Vastamerkkiset ionit ja neutraalit molekyylit pidättäytyvät sta-tionäärifaasin huokosiin, jolloin niiden eteneminen on hitaampaa. Koon vaikutuksesta isompikokoiset ionit eivät mahdu pidättäytymään huokosiin, jolloin ne etenevät pieniko-koisempia nopeammin. [3, s. 140–141, 158–159; 4, s. 639.] Kuvassa 1 on esitettyä ioniekskluusio erottuminen kolonnissa.

Orgaanisten happojen ioniekskluusiomäärityksessä, ajoliuoksena on yleensä vahva happo. Tällöin saadaan heikoimman hapon dissosiaatiota ehkäistyä. Stationäärifaasin vahvan negatiivisen varauksen takia saadaan heikosti varautuneet analyytit kiinnitty-mään stationäärifaasiin ja ajoliuoksen vahvan hapon negatiiviset ionit eluoitumaan en-simmäisenä. Periaatteessa orgaaniset hapot eluoituvat pKa:n mukaan, aloittaen pie-nimmästä arvosta. Mutta tämä ei aina toteudu, sillä stationäärifaasin hydrofobiset vuo-rovaikutukset vaikuttavat myös eluoitumiseen, hidastaen hydrofobisia orgaanisia hap-poja. [5.]



Kuva 1. Ioniekskluusio-erottuminen kolonnissa [5].

### 2.1.2 HILIC

Hydrofiilinen vuorovaikutus -kromatografiaa (HILIC) käytetään pienten polaaristen yhdisteiden määrittämisessä. Stationäärifaasi on polaarinen ja ajoliuos koostuu orgaanisesta liuottimesta ja vedestä. Tyypillisesti orgaanisen liuottimen määrä on 25–97 % ajoliuoksesta. Analyytit retentoituvat liikkuvan faasin ja stationäärifaasin pinnalle kertyvän vesikerroksen välillä. [4, s. 606–607.]

### 2.1.3 Diodirividetektor

Diodirividetektor muodostuu valodiodeista, jotka vierekkäin muodostavat rivin. Rivissä olevat valodiodit mittaavat kukin itsenäisesti niihin tulevaa valoa siten, että eri aallonpituuden valo osuu eri diodeille. Tämä mahdollistaa kaikkien aallonpituuksien mittaamisen samalla kertaa. Valo suunnataan diodirividetektoriin hilan kautta ja optiikan kiinteyden vuoksi aallonpituus ei muutu mittausten välillä. [3, s. 58.]

## 2.2 Massaspektrometria

Massaspektrometriassa hyödynnetään massaspekttrin tuottamaa massajakaumaa. Havaittavat massafragmentit erotellaan toisistaan niiden massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) mukaan. Varauksen ollessa +1  $m/z$ -suhde on numeraalisesti sama kuin massaluku. Ionin

varauksen ollessa +2, m/z-suhde on puolet massasta. Massaspekttriä tutkimalla saadaan selville hajonneen molekyylin kappaleiden massat. Spektrit kuvaavat molekyylien rakennetta, joiden avulla molekyylit voidaan tunnistaa. Massaspektrometriaa käytetään yleensä liitettynä kromatografiin, jolloin saadaan monipuolisempia analyysejä. [3, s. 122; 4, s. 502.]

Massaspektrometrin rakenteeseen kuuluvat ionisointi, massaerottelu ja detektointi. Tutkittavat yhdisteet erotellaan ennen näytteen syöttöä kromatografisesti. Tämän jälkeen yhdisteet syötetään ionilähteeseen, joka ionisoi molekyylit. Vain suhteellisen pieni osa molekyyleistä ionisoituu. Ionilähteestä ionit lennätetään kiihdyttämällä ne massa-analysaattoriin, missä ionien erottelu tapahtuu. Laitteistossa tarvitaan tehokasta pumppausta korkean vakuumin saamiseksi. Paineen pitää olla alle  $10^{-4}$  mbar, jotta lentoradallaan olevat ionit eivät törmäisi sisällä oleviin kaasumolekyyliin. Myös epäpuhtauksien kuten veden poistaminen laitteistosta tapahtuu pumppujen avulla. Massaerottelusta ionit suunnataan detektoriin, joka tehokkaasti havaitsee erimassaiset ionit. Mitä suurempi signaali kyseisellä ionilla on, sitä suurempi määrä niitä on. [3, s. 122–123.]

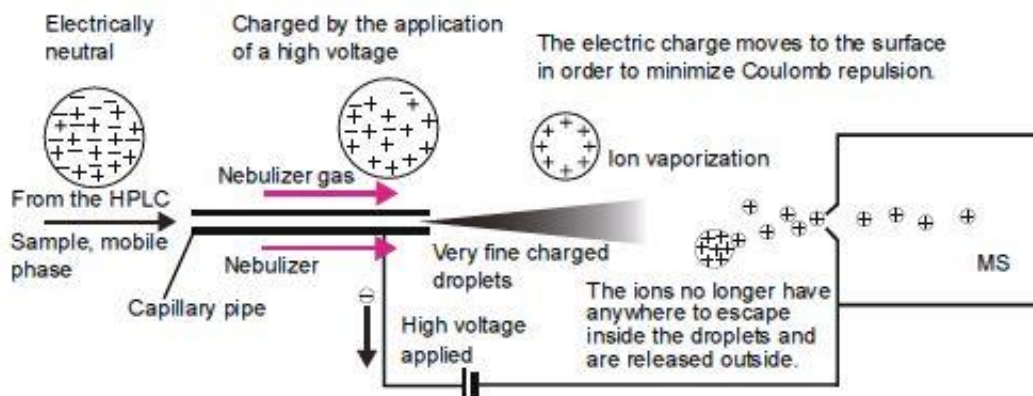
Massaspektrometristä saatava signaali on verrannollinen syntyvien ionien määrään ja sitä kautta verrannollinen alkuperäiseen molekyylin määrään. Summaspekttrin laskeminen tapahtuu eri komponenttien spektristä, näytteen ollessa tunnettujen yhdisteiden seos. Näytteessä olevaa yhdisteen osuutta kuvataan spektrin kertoimella. [3, s. 122.]

### 2.2.1 Kvadrupolianalysaattori

Kvadrupolianalysaattori on massa-analysaattoreista yleisin ja koostuu neljästä sauvasta. Ne ovat yhdensuuntaiset ja vastakkain olevat sauvat on kytketty toisiinsa sähköisesti. Värähtelevä sähkökenttä tuotetaan sauvojen avulla, joilla ohjataan ionien kulkua. Ionien lennätys sauvaston läpi tapahtuu tasajännitteellä sekä radiotaajuudella muuttuvalla vaihtojännitteellä. Tietyn m/z-suhteen ionit pääsevät sopivilla tasa- ja vaihtojännitteillä sauvaston läpi detektorille, kun muut ionit törmäävät sauvastoon. Ionien eroteluun vaikuttaa niiden lentonopeus. Mitä kauemmin ionit viipyvät analysaattorissa, sitä paremmin ne erottuvat. [3, s. 125–126.]

### 2.2.2 Sähkösumutusionisointi

ESI (electrospray ionization) eli ilmanpaineessa tapahtuva sähkösumutusionisointi, joka saadaan aikaan korkean jännitteen ja typpikaasun avulla. Sähkösumutusionisointiossa eluenttiliuos virtaa ohuessa kapillaarissa, jossa on muutaman kilovoltin jännite verrattuna sumutuskammioon. Liuos sumutetaan kapillaarin päästä ympäriltä tulevan typpikaasun avulla. Sumutuksessa syntyvät pisarat ovat varaukseltaan samat kuin kapillaarin lisätty jännite. Liuottimen haihtuvuuden takia pisarat pienenevät, jolloin varaustiheys kasvaa. Varaustiheyden kasvun takia sähköinen poistovoima on suurempi kuin pintajännitys, jolloin pisarat hajoavat pieniksi aerosolihiukkasiksi. Liuottimen haihtumisen ja pisaroiden hajoamisen vaikutuksesta tutkittavan yhdisteen ionit vapautuvat. Niiden muoto ei muutu, vaan ne ovat samassa muodossa kuin eluointiliuoksessa. Sähkösumutuksessa analyttien fragmentoituminen on vähäistä ja spektrit ovat yksinkertaisia. Fragmentoitumista voidaan lisätä törmäyttämällä ioneja kaasuun ennen kartiota. Yleensä törmäytyskaasuna käytetään typpikaasua. Sähkösumutusionisaatiolla avulla voidaan tehdä joko positiivisen ionin tai negatiivisen ionin massaspektrometriaa. Negatiivisen ionin massaspektrometriassa sähkösumutuksen jännitteet ovat käänteisiä. [3, s. 211; 4, s. 521.] Kuvassa 2 on esitettyä sähkösumutusionisaation periaate.



Kuva 2. Positiivisten ionien sähkösumutusionisointi [6, s. 18].

### 2.2.3 Detektointi

Massaspektrometriassa detektointi tehdään elektronimonistimella. Elektronimonistin muuttaa ionien energian sähköpulsseiksi. Ionit törmäytetään elektronimonistimen sisäpintaan (dynodeihin), joista irtoaa elektroneja. Irrotetut elektronit törmäytetään uuteen seinämään, jolloin vapautuu lisää elektroneja. Törmäytyksiä jatketaan elektronimonistimi-

en perää (anodia) kohti ja elektroneista muodostuvaa sähköpulsssia vahvistetaan törmäysten myötä. Lopuksi detektointi tapahtuu vahvistetusta sähköpulsssista, jonka antama signaali on verrannollinen analysaattorin läpi kulkevien ionien määrään. Negatiivisten ionien detektoinnissa ennen elektronimonistinta on positiivisesti varattu dynodi, joka törmäyksen johdosta vapauttaa positiivisia ioneja elektronimonistimeen. [3, s. 128; 4, s. 503, 514.]

### 2.3 Kalibrointi sisäisen standardin menetelmällä

Kalibroinnissa käytettävässä sisäisen standardin menetelmässä analysoitavaan näytteeseen lisätään tunnettu pitoisuus sisäistä standardia. Sisäinen standardi on ominaisuuksiltaan analysoitavan aineen kaltainen, jolloin voidaan ottaa huomioon analysoitavaan aineeseen mahdollisesti kohdistuvat muutokset. Esimerkiksi näytteenkäsittelyssä mahdollisesti syntyvät hävikit tulee otettua huomioon sisäisen standardin avulla. Kalibrointiliuokset valmistetaan siten, että analysoitavan aineen pitoisuudet kattavat koko kalibrointialueen. Kaikkiin kalibrointitasoihin lisätään sisäistä standardia sama määrä. Lopuksi määritetään analyttien signaaleiden arvot ja sisäisen standardin signaalin arvo. Analyytin antaman signaalin arvon suhteella sisäisen standardin antaman signaalin arvoon, tehdään kalibrointisuora signaaleiden suhde pitoisuuden funktiona. Oletuksena on kuitenkin, että analyytin ja sisäisen standardin signaalin arvot ovat konsentraatioon suoraan verrannollisia vastaavalla tavalla. [3, s. 21–22.] Vastekerroin kuvaa analyytin ja sisäisen standardin vasteiden suhdetta näiden pitoisuuksien ollessa samoja [4, s. 109–110]. Lineaarisovituksessa analyytin pitoisuuden laskennassa sovellettiin kaavaa 1 ja toisen asteen sovituksessa kaavaa 2.

$$\frac{Area_A}{Area_{IS}} = a \frac{[A]}{[IS]} + b \quad (1)$$

missä

$Area_A$  = analyytin piikin pinta-ala

$Area_{IS}$  = sisäisen standardin piikin pinta-ala

$[A]$  = analyytin pitoisuus

$[IS]$  = sisäisen standardin pitoisuus

$a$  = vastekerroin

$b$  = vakio

$$\frac{Area_A}{Area_{IS}} = a \left( \frac{[A]}{[IS]} \right)^2 + b \frac{[A]}{[IS]} + c \quad (2)$$

missä

$Area_A$  = analyytin piikin pinta-ala

$Area_{IS}$  = sisäisen standardin piikin pinta-ala

$[A]$  = analyytin pitoisuus

$[IS]$  = sisäisen standardin pitoisuus

$a$  = vastekerroin

$b$  = vastekerroin

$c$  = vakio.

## 2.4 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuuton (SPE, solid phase extraction) tarkoituksena on puhdistaa näytteestä ei-toivotut yhdisteet ja rikastuttaa tutkittavia analyyttejä. Pidähtäytyminen tapahtuu kiinteään sorbenttimateriaaliin, josta yhdisteet irrotetaan liuottimella. Menetelmässä ei-toivotut yhdisteet eivät joko pidäty sorbenttiin tai ovat helposti poistettavissa siitä. Pidähtäytymiseen vaikuttavat yhdisteiden, sorbentin ja liuoksen ominaisuudet. Sorbentin valinta on tärkeä, jotta analyytit saadaan pidähtäytymään ja pystytään eluoimaan järkevillä määrillä liuotinta. Sorbentilla on vain rajallinen kyky pidättää analyyttejä, joten tilavuuden tulee olla riittävä. Yleensä absorptiokyky on enintään 5 % sorbentin painosta. Sorbentit jaotellaan normaalifaasisorbentteihin ja käänteisfaasisorbentteihin.

Kiinteäfaasiuutossa ensiksi kunnostetaan SPE-sorbentit sopivalla liuottimella käyttäen 1–5 putken tilavuutta. Tarkoituksena on kostuttaa sorbentti ja asettaa funktionaaliset ryhmät valmiiksi vuorovaikuttamaan analyyttien kanssa. Liuotin huuhdellaan pois toisella liuottimella, jonka ominaisuuksien avulla saadaan parhaat mahdolliset olosuhteet analyyttien pidähtäytymiseen. Ennen näytteen syöttöä sorbenttia ei saa päästää kuivumaan, kuivuminen estää pidähtäytymisen sorbenttiin. Näytteen syötön jälkeen epäpuhtaudet huuhdotaan pois sopivalla liuottimella. Huuhtelussa analyytit pidähtäytyvät sorbentissa eivätkä huuhtoudu liuottimen mukana. Huuhtelun jälkeen analyytit eluoidaan mahdollisimman pienellä eluenttilavuudella. Erotus voi myös tapahtua toisella tapaa, jossa analyytit eluoidaan ennen tiukemmin pidähtyneitä matriisikomponentteja. [7, s. 99–114.]

## 2.5 Karboksyylihapot

Karboksyylihapot ovat orgaanisia yhdisteitä, joiden funktionaalinen ryhmä on karboksyyli-ryhmä  $\text{--COOH}$ . Karboksyylihapot ovat heikkoja happoja, dissosioituen vain osaksi vesiliuoksessa. Lyhytketjuiset karboksyylihapot liukenevat hyvin veteen, johtuen niiden kyvystä muodostaa vetysidoksia. Yli kuuden hiilen karboksyylihapot liukenevat huonosti tai eivät ollenkaan veteen, mutta emästen kanssa muodostuneet karboksyylihappojen suolat ovat yleensä erittäin vesiliuokoisia. Luovuttaessaan protonin karboksyylihapon happiatomit voivat jakaa negatiivisen varauksen vakauttaen ionin. Karboksyylihappoja esiintyy kaikissa elävissä organismeissa, ja ne ovat mukana melkein kaikissa metabolisissa prosesseissa. [8, s. 54–55, 778, 782–784, 800–802.]

## 2.6 Validointi

Validointi on menetelmän toimivuuden toteamista ja testaamista. Validoinnilla osoitetaan menetelmän sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen. [9, s.25.] Validointi suoritettiin tekemällä näytematriisille toistettavuus, oikeellisuus ja määrittäysraja. Kalibroinnin tarkkuutta seurattiin laiteohjelman antamien tarkkuusarvojen kautta. Validointi tehtiin yrityksen ja menetelmän tarpeiden mukaan supistetusti. [10.]

### 2.6.1 Analyyttien valinta

Analyytit jaettiin ennen validointia niihin, joiden mittaaminen oli kvantitatiivista ja niihin joiden mittaaminen oli semi-kvantitatiivista. Kvantitatiiviset analyytit olivat niitä, joilla oli oma sisäinen standardi. Nämä analyytit olivat pääasiallisesti validoinnin kohteena. Semi-kvantitatiiviset analyytit olivat niitä, joilla ei ollut omia sisäisiä standardeja. Omien sisäisten standardien puutteen vuoksi, matriisiefektien vaikutusta ei tarkalleen tiedetä. Validoinnissa näiden analyyttien osalta käytettiin löysempiä raja-arvoja. [10.] (Taulukot 1 ja 2.)



Taulukko 1. Kvantitatiiviset analyytit ja sisäiset standardit [11].

Analyytti	Deuteroitu sisäinen standardi	Validointiin sisällytetty näytematriisi
Etikkahappo	Etikkahappo	Öljy
Propaanihappo	Propaanihappo	Öljy
Butaanihappo	Butaanihappo	Öljy
Pentaanihappo	Pentaanihappo	Öljy
Heksaanihappo	Heksaanihappo	Öljy
2-Hydroksipropaanihappo (maitohappo)	Natrium L-laktaatti	Öljy
Butaanidihappo	Butaanidihappo	Öljy

Taulukko 2. Semi-quantitatiiviset analyytit ja sisäiset standardit [11].

Analyytti	Deuteroitu sisäinen standardi	Validointiin sisällytetty näytematriisi
Muurahaishappo	Natrium L-laktaatti	Öljy
Oksoetaanihappo	Natrium L-laktaatti	Öljy
Hydroksietaanidihappo	Natrium L-laktaatti	Öljy
2-Metyylipropaanihappo	Butaanihappo	Öljy
3-Metyylibutaanihappo	Pentaanihappo	Öljy
Hydroksibutaanidihappo	Butaanidihappo	Öljy
Pentaanidihappo	Butaanidihappo	Öljy

Glukoronihapon menetelmävalidoinnin katsottiin kattavan myös galakturonihappo, näiden retention ja kemiallisen samankaltaisuuden takia [11].

Validoinnin ulkopuolelle jätettiin osa semi-quantitoitavista analyyteistä. Ne ovat esitettyinä taulukossa 3.

Taulukko 3. Validoinnin ulkopuolelle jätetyt analyytit ja niiden sisäiset standardit [11].

Analyytti	Deuteroitu sisäinen standardi
Propaanidihappo	Butaanidihappo
Trans-buteenidihappo	Butaanidihappo
Metyleenibutaanidihappo	Butaanidihappo

## 2.6.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuus (repeatability) on täsmällisyyttä, joka määritetään mittaamalla näytettä lyhyellä aikavälillä toistettavissa olosuhteissa. Määritykset tehdään rinnakkaismäärityksinä erityyppisistä näytteistä useilla eri pitoisuustasoilla. [9, s. 37.] Toistettavuus analyysiteille laskettiin päivittäisten tulosten suhteellisen keskihajonnan kautta (RSD, relative standard deviation) (kaava 3).

$$\text{suhteellinen keskihajonta} = \frac{\text{Keskihajonta}}{\text{Keskiarvo}} * 100\% \quad (3)$$

Menetelmän uusittavuus on täsmällisyyttä, joka määritetään samasta näytteestä, samalla menetelmällä eri laitteella eri laboratorioissa. Määritykset voidaan tehdä laboratorioden välisissä vertailukokeissa. Laboratorion sisäinen uusittavuus testataan analysoimalla samaa hyvin säilyvää näytettä pitkällä aikavälillä. Analyysijä voi teettää eri laitteistoilla tai eri työntekijällä. Vaihtelemalla laitteistoa ja työntekijöitä saadaan luotettavimpia analyysituloksia. Uusittavuudella ja toistettavuudella saadaan kuva menetelmän täsmällisyydestä, joka kertoo menetelmän satunnaisvirheestä. [9, s. 37; 12, s. 25–26; 13, s. 5.] Sisäinen uusittavuus analyysiteille määritettiin kaavan 4 mukaan, kaikkien päivien suhteellisen keskihajonnan kautta 95 %:n luottamustasolla:

$$\text{Sisäisen uusittavuuden 95 \% luottamustaso} = \frac{t * \text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} * 100\% \quad (4)$$

missä

t = studentin t-jakauma 95 %:n luottamustasolla.

## 2.6.3 Oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuus kertoo kuinka lähellä ollaan oikeaa arvoa ja sen avulla saadaan kuvaa systemaattisesta virheestä. Se määritetään vertaamalla menetelmästä saatuja mittaustuloksia tunnettuun referenssiarvoon. Referenssiarvo on saatu joko tunnetusta vertailumateriaalista tai toisen tunnetun menetelmän avulla. Mikäli ei ole saatavilla sertifioituja vertailumateriaaleja, voidaan myös käyttää itse valmistettuja vertailumateriaaleja. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi lisäämällä puhdasta ainetta tarkoitukseen sopiviin matriiseihin. Oikeellisuutta voidaan myös tutkia laboratorioden välisin

vertailukokein. [9, s. 35.] Systemaattinen virhe näkyy määityksessä, kun saatu tulos on suurempi tai pienempi kuin todellinen arvo. Virhe ( $\beta$ ) on esitetty kaavassa 5:

$$\beta = X - \mu \quad (5)$$

missä

$X$  = määrittämällä saatu tulos (usean määityksen keskiarvo)

$\mu$  = todellinen arvo.

Oikeellisuus voidaan myös määrittää saantokokeiden avulla. Saantokoe tehdään standardin lisäyksellä, jonka tarkoituksena on osoittaa näytteessä mahdollisesti määitystä häiritsevät yhdisteet. Standardin lisäyksessä tunnettu määrä määritettävää yhdistettä lisätään näytteeseen ja lisäyksiä voidaan tehdä  $n$  kertaa. Alkuperäinen näyte ja lisäyksen sisältämä näyte analysoidaan molemmat. Keskiarvoa verrataan tilastollisesti ennakolta tavoitteeksi asetettuun saantoon. Saanto ( $R$ ) lasketaan kaavasta 6:

$$R = \frac{100\%(S-U)}{C} \quad (6)$$

missä

$C$  = lisätyn standardiliuoksen tunnettu pitoisuus

$U$  = alkuperäisen näytteen mitattu pitoisuus

$S$  = lisäyksen sisältävän näytteen mitattu pitoisuus.

Määitys voidaan tehdä useassa eri sarjassa ( $m$ ) ja usean rinnakkaismääityksen ( $n$ ) avulla. Keskivirhe ( $s_R$ ) sarjan  $m$  keskiarvolle saadaan kaavasta 7:

$$s_R = s/\sqrt{m} \quad (7)$$

missä

$m$  = sarjojen lukumäärä, joista keskihajonta  $s$  on laskettu.

Saannon keskiarvon  $R$  voidaan olettaa olevan välillä  $R \pm t_{0,05} s_R$  95 %:n todennäköisyydellä. Useimmissa tapauksissa  $R$  voidaan hyväksyä, jos se on välillä 95–105 %. [14, s. 33–37.]

#### 2.6.4 Määrittysraja

Määrittysraja (limit of quantitation, LOQ) määrittää pienimmän pitoisuuden analysoitavalle aineelle, joka voidaan ilmoittaa hyväksyttävällä tarkkuudella. Määrittysraja voidaan ilmoittaa signaali-kohinasuhteen (S/N) avulla, jonka arvo on riippuvainen menetelmälle asetettavista tarkkuusvaatimuksista. Yleensä käytetään arvoa  $\geq 10$ , jolloin suhteellinen standardipoikkeama on noin 10 %. Määrittysraja tulee asettaa niin, että pitoisuudet antavat luotettavia ja toistettavia tuloksia. Määrittysrajan alapuolelle toteamisrajaan asti on niin sanottu harmaa alue, jossa voidaan näytteiden sisältävät analyytit luotettavasti todeta. Harmaan alueen pitoisuusalueeseen liittyy kuitenkin suuri epävarmuus, joka pitää kvantitatiivisessa määrittämisessä ottaa huomioon. [13, s. 7.]

#### 2.7 Näytematriisit

Menetelmän kehityksessä käytettävät näytteet olivat öljy- ja vesipohjaisia. Öljypohjaiset näytteet olivat pääasiassa palmuöljynäytteitä. Vesipohjaiset näytteet olivat lignoselluloosanäytteitä peräisin Crude Bio Oil -valmistusprosessin eri vaiheilta.

Uusiutuvan NExBTL- dieselin valmistuksessa vetykäsittelyllä kasviöljystä tai eläinperäisestä rasvasta saadaan kemialliselta koostumukseltaan fossiilisten polttoaineiden kaltainen hiilivety. Saatua tuotetta voidaan käyttää sellaisenaan tai sekoittamalla fossiiliseen dieseliin. [15.] Öljypohjaisten näytteiden happojen määrittämisellä seurattiin näytteen soveltuvuutta NExBTL-prosessiin. Hapot aiheuttavat korroosiota ja osa hapoista on erittäin haisevia, varsinkin lämmittäessä. Osaa hapoista pidetään myös tuloksena mahdollisesta bakteereiden fermentaatiosta.

Lignoselluloosa on yleinen käsite, jolla kuvaillaan useimpien kasvien rakenneosia, jotka koostuvat selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä. Lignoselluloosan biomassasta saadaan etanolia. Hydrolyysissä lignoselluloosan hemiselluloosa ja selluloosa pilkkoutuvat sokereiksi, joita voidaan fermentoida etanoliksi. [16.] Lignoselluloosanäytteistä happojen seurannalla saatiin kuvaa prosessin toimivuudesta. Happojen avulla voitiin esimerkiksi seurata ei toivottua bakteeritoimintaa, lignoselluloosan hydrolyysiprosessin kattavuutta tai jopa itse lignoselluloosan rakennetta. [10.]

### 3 Kemikaalit ja laitteisto

Menetelmän kehityksessä käytettiin erilaisia liuottimia ja reagensseja. Kaikki käytettävät liuottimet olivat LCMS-laatuksia. Käytettävä laboratoriovesi oli LCMS-laatuista Milli-Q -vettä. Happostandardien ja -liuoksien valmistuksessa käytettiin puhtaita  $\geq 99,5$  % olevia reagensseja. Kaikki menetelmän kehityksessä tehtävät testit tehtiin samalla HPLC-MS -laitteella. Menetelmää kehittäessä käytettiin laboratorion tavanomaisia työvälineitä kuten automaattipipettejä, analyysivaakoja ja mittalaseja sekä mittavälineitä.

#### 3.1 Käytetyt reagenssit

Taulukossa 4 on lueteltu puhtaat happoreagenssit, joita käytettiin happostandardeiden teossa.

**Taulukko 4. Puhdasaine reagenssit.**

Reagenssi	IUPAC nimi	Valmistaja	Tuote nro
Formic acid	Metaanihappo	Fisher Scientific	A117-50
Acetic acid	Etaanihappo	Fisher Scientific	A113-50
Glyoxylic acid monohydrate	Oksoetaanihappo	Sigma-Aldrich	G10601
Glycolic acid	Hydroksietaanihappo	Sigma-Aldrich	124737
Propionic acid	Propaanihappo	Fluka	94425
Pyruvic acid	2-Oksopropaanihappo	Sigma-Aldrich	P2256-5G
Lactic acid	2-Hydroksipropaanihappo	Fluka	71718-10G
Butyric acid	Butaanihappo	Fluka	19215
Isobutyric acid	2-Metyylipropaanihappo	Sigma-Aldrich	I1754
Valeric acid	Pentaanihappo	Fluka	75054
Isovaleric acid	3-Metyylibutaanihappo	Sigma-Aldrich	129542
Hexanoic acid	Heksaanihappo	Sigma-Aldrich	153745
D-Galacturonic acid	(2S,3R,4S,5R)-2,3,4,5-tetrahydroksi-6-oksoheksaanihappo	Fluka	73960
D-Glucuronic acid	(2S,3S,4S,5R)-2,3,4,5-tetrahydroksi-6-oksoheksaanihappo	Sigma-Aldrich	G5269
Malonic acid	Propaanidihappo	Fluka	63290
Maleic acid	Cis-buteenidihappo	Sigma-Aldrich	M0375
Fumaric acid	Trans-buteenidihappo	Fluka	47910
Succinic acid	Butaanidihappo	Fluka	14078
Malic acid	Hydroksibutaanidihappo	Sigma-Aldrich	240176
Itaconic acid	Metyleenibutaanidihappo	Sigma-Aldrich	I29204
Glutaric acid	Pentaanidihappo	Sigma-Aldrich	G3407
Alpha-Ketoglutaric acid	2-Oksopentaanidihappo	Fluka	75890

### 3.2 Sisäiset standardit

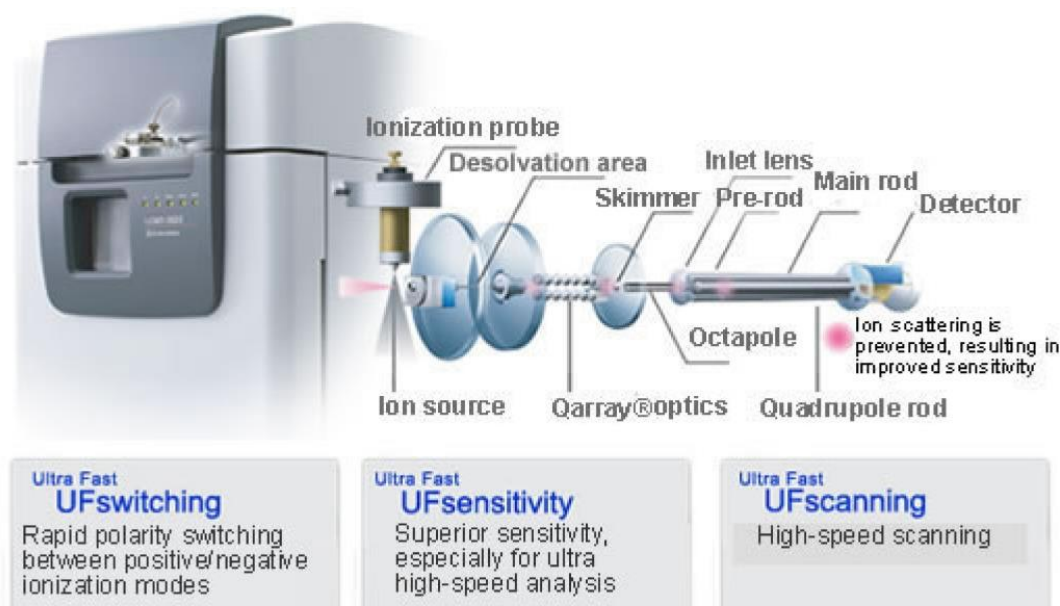
Menetelmän kehityksessä sisäisinä standardeina käytettiin stabiilia-isotooppileimattuja standardeja. Taulukossa 5 on lueteltu sisäiset standardit.

**Taulukko 5. Stabiili-isotooppileimatut sisäiset standardit.**

Deuteroitu sisäinen standardi
Etikkahappo
Propanihappo
Natrium L-laktaatti
Butaanihappo
Pentaanihappo
Heksaanihappo
Butaanidihappo

### 3.3 Laitteet

Työssä käytettiin Shimadzun LCMS-2020 (High performance liquid chromatograph mass spectrometer) laitetta (kuva 3). Laitteisto koostui kahdesta yksiköstä, nestekromatografista ja massaspektrometrasta. Nestekromatografi-yksikkö koostui kahdesta pumpusta, kaasunpoistajasta, kolonnista ja kolonniuunista sekä jäähdytettävästä näytteen syöttäjästä. Massaspektrometria oli DUIS-ionilähteellä varustettu mutta käytettiin vain ESI-sumutinta.



**Kuva 3. Shimadzu LCMS-2020 [17].**

### 3.3.1 Nestekromatografi

Nestekromatografiassa käytettiin isokraattista menetelmää ja ioniekskluusiokolonnia yhdisteiden erottelamiseen. Laitteessa käytettiin kahta eluenttia. Eluenttia A johdettiin näytteensyöttäjään, kun taas eluentti B johdettiin suoraan T-liitokseen ennen ionilähteeseen virtaamista. Kolonnista tuleva eluentti A johdettiin jakajaan (flow splitter), josta se jaettiin UV-detektoriin ja T-liitososaan. Nopea virtaus (high flow) jakajasta meni UV-detektoriin ja hidas virtaus (low flow) johdatettiin T-osaan. T-osassa yhdistyneet eluentit A ja B virtasivat T-osan kolmannen liitoksen kautta massaspektrometrin ionilähteeseen. UV-puolen detektoinnilla tarkkailtiin näytteen puhtautta eikä tehty kvantitatiivista määrittystä. Taulukossa 11 on esiteltynä nestekromatografian tiedot.

**Taulukko 6. Nestekromatografilaitteisto[11].**

<b>HPLC-laite</b>	Shimadzu Prominence
<b>Degasser, kaasunpoistaja</b>	DGU-20A3
<b>Pumppu (2 kpl)</b>	LC-20ADXR
<b>Jäähdyttävä näytteensyöttäjä</b>	SIL-20ACXR
<b>Näytteensyöttäjän lämpötila</b>	4 °C
<b>Injektointitilavuus</b>	50 µl
<b>Kolonniuuni</b>	CTO-20AC
<b>Esikolonne</b>	Phenomenex Carbo-H 4 x 3.0 mm ID SecurityGuard Cartridge
<b>Esikolonnin pidike</b>	Phenomenex SecurityGuard Cartridge Kit
<b>Kolonne</b>	Phenomenex rezex ROA Organic Acid H+ 300 x 7.80 mm
<b>Kolonniuunin lämpötila</b>	40°C
<b>DiodeArray Detector (DAD)</b>	SPD-M20A
<b>Flow splitter</b>	ASI model 620 (1:10 split)
<b>-High flow</b>	0,54 ml/min
<b>-Low flow</b>	0,06 ml/min

### 3.3.2 Massaspektrometri

Massaspektrometrin tiedot löytyvät taulukosta 7.

Taulukko 7. Massaspektrometrialaitteisto.

<b>Massaspektrometri</b>	Shimadzu MS-2020
<b>Ionilähde</b>	DUIS (ESI ja APCI)
<b>Typpikaasun tuontipaine</b>	690 - 800 kPA
<b>Massa-analysaattori</b>	Kvadrupolianalysaattori
<b>Detektori</b>	Elektronimonistin

Menetelmän kehityksessä käytetyn ionilähteen säädöt ja asetukset löytyvät taulukosta 8.

Taulukko 8. ESI:n säädöt [11].

<b>Interface-jännite</b>	-4,5 kV
<b>DL lämpötilä</b>	250°C
<b>Heat Block:n lämpötila</b>	350°C
<b>Sumutuskaasu</b>	1,1 l/min
<b>Kuivauskaasu</b>	13 l/min
<b>ESI-probe:n sijainti</b>	2,5 mm DL-linjan aukosta
<b>Ionisointi</b>	ESI (-), negatiivimoodi

## 4 Työn suoritus

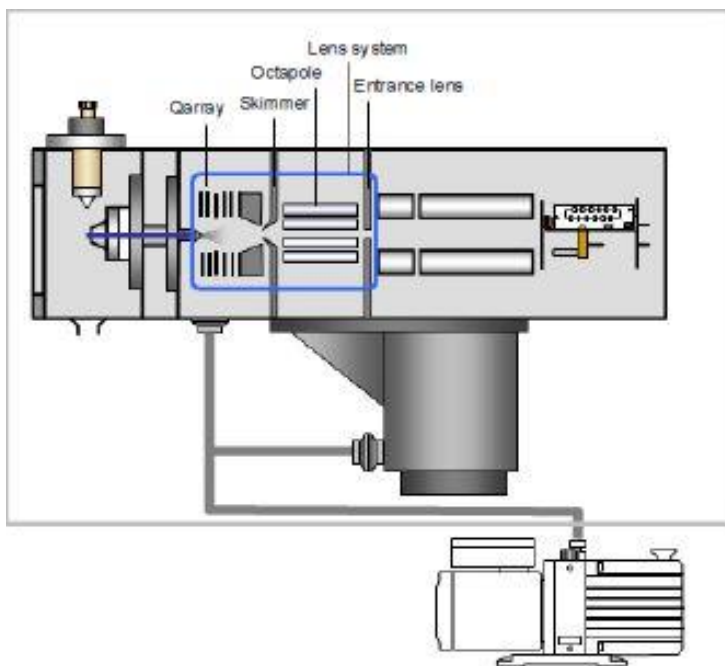
Menetelmän kehitys aloitettiin laitteen säätämisellä ja liuosten valmistuksella. Ajoliuoksien koostumus ja näytteen käsittely optimoitiin erilaisten testien avulla. Testien tuloksien perusteella päätettiin seuraavista toimenpiteistä vastaavan tutkijan johdolla.

### 4.1 Laitteen säätäminen karboksyylihapoille

Massayksikön jännitteet säädettiin ESI-ionisaatiota varten. Alustavasti säädökset tehtiin laitteen omalla autotune-ominaisuudella. Laitteeseen syötettiin standardiliuoksia, joissa oli analysoitavia analyyttejä. Laite säätää autotune-ominaisuudella resoluution, herkkyys ja massan kalibroinnin. Se myös tarkkailee intensiteetin voimakkuutta, jotta se ylittää vähintään spesifisen minimirajan. Tuning-tuloksia varten laite mittaa piikkien profiiliin sekä massaspektrin.



Manuaalisesti säädettiin massan linssien, Qarrayn ja oktapolin jännitteitä, jotta voitiin parantaa herkkyyttä hieman (kuva 4). Suurimmaksi osaksi tuning tehtiin tarkkailemalla muurahais-, propaani-, butaani-, pentaani- ja sitruunahapon intensiteettejä. Tuning-liuoksina käytettiin happostandardeja ja laitteen omaa auto-tune-liuosta, joka sisälsi polyetyleeniglykolia, polypropyleeniglykolia ja raffinoosia. Happostandardeista valmistetut tuning-liuokset valmistettiin isopropanoliin. Lopuksi säädettyjen asetuksien tuning file tallennettiin laiteohjelmaan oletusasetukseksi.



Kuva 4. Herkkyyteen vaikuttavien rakenneosien sijainti [6].

#### 4.2 Retentioaikojen selvittäminen

Asetusten säätöjen jälkeen pystyttiin selvittämään happojen retentioajat. Aloitettiin tekemällä kantaliuoksista n. 5 mg/4 ml olevia liuoksia. Retentioaikojen selvityksessä tarkalla pitoisuudella ei ollut väliä, koska tarkoituksena oli saada vain happojen piikit näkyviin. 5 mg/4 ml olevista happoliuoksista tehtiin seosliuoksia, joita ajettiin laitteessa. Kromatografiana käytettiin ioniekskluusiota. Happojen retentioajat tallennettiin niiden omaaville massaluvuille ilmestyneille piikeille. Epäselvissä tapauksissa, esimerkiksi liian monta lähekkäistä piikkiä yhdellä massaluvulla, ajettiin sen massaluvun omaavia happoja yksitellen. Epäselvät tapaukset yleensä johtuivat lähekkäin olevista happojen

massaluvuista tai jonkin hapon fragmentoitumisesta. Retentioajat taulukoitiin ja tallennettiin ohjelmaan.

#### 4.3 Ajoliuoksen testaaminen

Laitteessa käytettiin kahta ajoliuosta, A- ja B- liuosta. A-liuos toimi liikkuvana faasina kun taas B-liuoksella pyrittiin parantamaan ionisaatiota ennen näytteen syöttöä massaspektrometriin. A-liuos muodostui trifluorietikkahaposta (TFA) ja Milli-Q-vedestä. TFA:ta käytettiin ajoliuoksessa pH:n säätämisessä. TFA:n toimivuutta ajoliuoksen happona testattiin eri pitoisuuksilla.

Ajoliuosta testattiin myös vaihtamalla TFA suolahapoksi. Suolahappoa testattiin eri pitoisuuksilla. Sitä testattiin kahden reagenssin avulla, 30 % ja 37 %. Ajoliuokseen lisättiin myös asetonitriliä (ACN) orgaanisena komponenttina, jotta analyyttien retentioajat lyhenisivät. ACN:n määrää testattiin neljällä eri prosenttiosuudella 5, 10, 15 ja 20 %. Suolahappo aiheutti ionilähteessä suolaantumista, joten ESI-sumutin, ionilähteen seinät ja uloimmat osat pyyhittiin 50:50 suhteella olevalla isopropanoli:vesi-seoksella.

Ajoliuoksen koostumusta vaihdettiin HILIC-kolonnin testauksen aikana. A-liuos koostui 90:10 suhteessa olevasta ACN:vesi-seoksesta sekä 20 mM ammoniumbikarbonaatista. Testejä suoritettiin myös pienemmällä 15 mM ammoniumbikarbonaattipitoisuudella.

#### 4.4 Karboksyylihappoliuosten valmistus

Karboksyylihappoliuoksien valmistuksessa käytettiin puhtaita happoreagensseja. Puhdasta reagensseista valmistettiin kantaliuoksia, joita käytettiin erilaisten happoseoksien, työliuosten ja kalibrointiliuosten teossa.

##### 4.4.1 Kantaliuosten valmistus

Aluksi analyyttien kantaliuokset tehtiin punnitsemalla noin 5 mg puhdasta happoreagenssia 4 mg:aan TFA-liuosta. TFA:ta käytettiin nestekromatografiassa ajoliuoksena, jolloin samaa ainetta pyrittiin käyttämään myös kantaliuoksissa liuottimena. TFA:n pitoisuus oli 625 µM.

HILIC-kolonnia käytettäessä, ajoliuos vaihdettiin vastaamaan kolonnin tarpeisiin. Tämän myötä osa kantaliuoksista valmistettiin käyttäen ajoliuosta liuottimena. Kantaliuoksien teossa kokeiltiin myös pelkän Milli-Q-veden käyttöä liuottimena. Huonosti liukenevissa tapauksissa, kantaliuokset valmistettiin 50:50 suhteessa olevaan ACN:vesiliuokseen. Kantaliuoksien pitoisuudet vaihtelivat haposta riippuen, pitoisuuksia muokattiin sopivimmiksi aikaisempien ajotuloksien intensiteettien perusteella. Jos hapon intensiteetti oli liian pieni, lisättiin pitoisuutta ja jos taas liian suuri, vähennettiin. Tarkoituksena oli saada riittävät intensiteetit piikkien tunnistamiseen.

HILIC- kolonnin testiajojen jälkeen, vaihdettiin ioniekskluusio-kolonne. Ajoliuos vaihdettiin suolahappopohjaiseksi ja happojen kantaliuokset valmistettiin kolonnin ja eluentin vaihdon takia veteen. Huonosti liukenevat hapot valmistettiin 50:50 suhteessa olevaan ACN:vesiliuokseen.

#### 4.4.2 Analyyttien työliuoksen valmistus

Analyyttien työliuos valmistettiin pipetoimalla huoneenlämpöisiä analyttien kantaliuoksia 5 ml:n mittapulloon. Mittapullo täytettiin merkkiin vedellä. Eri analyttien pipetointimäärät arvioitiin aikaisempien mittausten tulosten perusteella. Säilytystä varten työliuos siirrettiin deaktivoituun 4 ml:n vialiin.

#### 4.4.3 Sisäisten standardiliuosten valmistus

Sisäisten standardien kantaliuokset valmistettiin stabiili-isotooppileimatuista standardien puhtasaineista. Puhtasaineita käsiteltiin eri tilassa analyttien puhtasaineiden kanssa, kontaminaation välttämiseksi. Kiinteitä puhtasaineita punnittiin edellisten mittaustulosten perusteella 4 ml:n deaktivoituihin vialeihin. Liuotinta pipetoitiin 3 ml gravimetrisesti ja puhtasaine liuotettiin vorteksoimalla. Liuottimena käytettiin vettä paitsi heksaanihapon ISTD:lle ACN:vesi-seosta yhden suhteella yhteen. Nestemäisille puhtasaineille ensiksi punnittiin 3 ml liuotinta 4 ml:n deaktivoituun vialiin ja pipetoitiin puhtasaine gravimetrisesti.

Sisäisen standardin työliuos valmistettiin pipetoimalla gravimetrisesti kantaliuoksia 10 ml:n mittapulloon. Pipetointimäärät arvioitiin alustavien mittaustulosten perusteella. Mittapullo täytettiin A-ajoliuoksella merkkiin. Mittapullostsa työliuos jaettiin 4 ml:n deaktivoituihin vialeihin. Liuosta säilytettiin jääkaapissa.

## 4.5 Näytteiden käsittely

Öljy- ja vesipohjaisille näytteille tehtiin omat näytteenesikäsittelyt. Öljypohjaisten näytteenesikäsittely oli paljon monivaiheisempi kuin vesipohjaisten, ja tämän takia käytettävien reagenssien määrä oli myös suurempi.

### 4.5.1 Neste-nesteuutto

Öljypohjaisten näytteiden esikäsittelyyn kuului neste-nesteuutto ja kiinteäfaasiuutto. Menetelmän kehityksen aikana oli jo aikaisemmin tehty neste-nesteuutolle menettelyohje, jota käytettiin testien perustana. Ohjeen mukaan näytettä punnittiin eppendorf-putkeen ja lisättiin kloroformia liuottamista varten. Näyte liuotettiin kloroformiin ravistamalla. Lisättiin vettä, jonka pH 9–10 oli säädetty käyttäen ammoniakkin vesiliuosta ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Sekoitettiin ravistelemalla. Lopuksi sentrifugisoitiin 12 000 rpm:ssä ja pipetoiitiin ylempi faasi näytevialiin. Näytteiden esikäsittelyn vaikutusta testattiin useilla testeillä, joissa näytteelle tehtiin neste-nesteuutto sekä kiinteäfaasiuutto. Testattiin myös pelkän neste-nesteuuton vaikutusta jättäen näytteenkäsittelystä kiinteäfaasiuutto pois. Testeissä vältettiin tekemästä montaa muutosta kerralla, jotta yhden muutoksen vaikutus saataisiin helpommin selville.

Ensimmäisissä neste-nesteuutoissa huomattiin näytteen pH:n olleen liian korkea kiinteäfaasiuuttoa varten. Tämän vuoksi veden pH:n muutoksesta luovuttiin ja testattiin pH:n muutosta vasta neste-nesteuuton jälkeen pipetoimalla emästä uutettuun näytteeseen. Testattiin  $\text{NH}_4\text{OH}$ :n vaikutusta kolmella eri pitoisuudella 0,05, 0,5 ja 5 %. Kiinteäfaasiuuttoa varten tavoite-pH oli 7–9, jotta deprotonoituneet hapot pidättäytyisivät SPE-putkeen ja lähimmäksi päästiin  $\text{NH}_4\text{OH}$ :n pitoisuuden ollessa 0,5 %. (Liite 2.)

Neste-nesteuuton testeissä 86–87 testattiin veden lisäyksen jälkeen tulevan sekoituksen vaikutusta. Testattiin sekoitusta vorteksoimalla sekä lämmitettävällä ravistelijalla. Testeissä käytettiin rinnakkaismäärityksiä. Testissä 86 näytettä vorteksoitiin nopeudella 7 – 8, noin 30 s ja testissä 87 näytettä ravisteltiin ravistelijassa 25 °C-asteen lämpötilassa, 5 min kierrosnopeudella 850 rpm. Testissä 87 huomattiin toisen rinnakkaismäärityksen huono liukeneminen ravistelijassa. Näyte liuotettiin vorteksoimalla ja ravisteltiin uudelleen. Mittaustulosten perusteella sekoitustavoissa ei ollut eroja. Vorteksointia päätettiin käyttää sekoituksessa, sen ollessa helpompi ja nopeampi tapa sekoittaa. (Liite 2.)

Testien 88–90 päätarkoituksena oli kiinteäfaasiuuton testaus. Testeissä selvitettiin asetonitriliin, metanolin sekä pienemmän näytemäärän vaikutusta kiinteäfaasiuutossa, joten neste-nesteuutot tehtiin samalla lailla. Neste-nesteuutossa lisättiin näytteen ja veden määrää, jotta loppupipetointi näytevialiin olisi helpompaa, kloroformin määrää vähennettiin. Veden ja näytemäärän lisäyksen takia, emäksen määrää nostettiin. (Liite 2.)

Testissä 91 testattiin  $\text{NH}_4\text{OH}$ :n vaikutusta neste-nesteuutossa. Tehtiin kolme uuttoa, joista yhteen ei lisätty  $\text{NH}_4\text{OH}$ :ta ja kahteen muuhun sitä lisättiin. Kiinteäfaasiuutto tehtiin toisesta esikäsitelystä näytteestä, johon oli lisätty  $\text{NH}_4\text{OH}$ :ta. (Liite 2.)

Neste-nesteuuttotesteissä 1–3 lisättiin sisäisen standardin pipetointi uuttoon. Sisäinen standardi lisättiin näytteen punnituksen jälkeen, jolloin se kompensoi mahdollisimman paljon syntyviä häiriöitä analyyttien määrittämisessä. Määrittämiä testissä tehtiin 7 kappaletta, mukaan lukien nollanäyte. Muutettavia parametreja olivat inkubointi, ISTD:n määrä ja  $\text{NH}_4\text{OH}$ :n määrä. (Liite 2.)

Testissä 4 testattiin dikloorimetaanin soveltavuus. Testissä haluttiin saada selville dikloorimetaanin soveltavuus liuottimena kloroformin tilalla. Määrittämiä tehtiin 2 kappaletta, joista toinen näyte oli dikloorimetaani ja pelkän veden lisäys. Itse soveltavuusnäytettä kuumennettiin  $60\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa 240 min. Liuottimia testattiin vielä uudestaan muuttaen neste-nesteuutossa veden tilalle emästä. Vesilisäyksen tilalle muutettiin  $\text{NH}_4\text{OH}$ :ta kahdella eri vahvuudella.  $\text{NH}_4\text{OH}$ :n vahvuudet testeissä olivat 0,05 ja 0,005 %. Näytteenä toimi edelleen sama öljypohjainen näyte, mutta siitä jouduttiin vähyyden takia käyttämään kahta eri näytepulloa. Tämän vaihdoksen myötä myös testejä lisättiin. Testejä tehtiin 13 kappaletta, joista 3 toimi nollanäytteenä. Jokaisesta liuottimesta tehtiin oma nollanäyte ilman  $\text{NH}_4\text{OH}$ :n lisäystä. Liuottimena testeissä käytettiin dikloorimetaania ja kahta eri kloroformia, joista toisessa stabilisaattorina toimii etanoli. (Liite 2.)

Testissä 5 testattiin kuumennuksen vaikutus ilman näytteen inkubointia. Tarkoituksena oli saada selville näytteenkuumennuksen vaikutus pitoisuuteen. Määrittämiä tehtiin 8 kappaletta, joista yksi toimi nollanäytteenä ja yksi toimi pelkkänä veden lisäyksenä kloroformiin. Näytteitä kuumennettiin  $60\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa 6 kuumennusaikapisteen mukaan. Ensimmäinen piste lähti 0 min:sta ja viimeinen piste oli 240 min. (Liite 2.)

#### 4.5.2 Kiinteäfaasiuutto

Öljynäytteille testattiin kiinteäfaasiuuton (SPE, solid phase extraction) soveltuvuutta matriisiin poistamiseksi. Kiinteäfaasiuutto tehtiin näytteenkäsittelyssä neste-neste-uuton jälkeen. Menettelyohje kiinteäfaasiuutolle oli tehty aikaisemmin, perusteena putken valmistajan antamat tiedot. Kiinteäfaasiuutossa käytettiin 10 mg/1 ml SOLA-AX-SPE-putkia, joissa on vahva anionin vaihtaja. Kiinteäfaasiuutto aloitettiin putken alustamisella ja alustuksen jälkeen vaihdettiin vastaioni emäksellä. Vastaionin vaihdoksen jälkeen pipetoitiin näyte putkeen ja imeytettiin absorbenttiin. Tämän jälkeen suoritettiin matriisiin pesu pesuliuksella ja pesuliuos pestiin pois. Näytteen analyytit liuotettiin absorbentista ajoliuksella. Jokaisessa vaiheessa käytettiin pientä alipainetta, jos nesteen virtausta putken läpi ei muuten tapahtunut. Hana suljettiin ja nestevirtaus lopetettiin aina, kun nestepinta saavutti absorbentin ylärajan. Näytteen imeytymisessä absorbenttiin käytettiin hidasta virtausta. (Liite 1.)

Kiinteäfaasiuuttotestejä tehtiin muuttamalla pesuliuksia sekä niiden määrää. Testejä tehtiin myös näytemäärän vaikutuksesta. Yhden testin aikana pyrittiin välttämään liian monen muuttujan muuttamista, jotta pystyttiin seuraamaan yhden muuttujan vaikutusta. Testit tehtiin TFA:n ollessa ajoliuoksen happona.

Kiinteäfaasiuutot aloitettiin tekemällä muuttamatta menettelyohjetta, jotta saataisiin kuva uuton vaikutuksista. Testissä käytettiin näytteen lisäksi referenssinäytettä, jotta kiinteäfaasiuuton vaikutukset nähtäisiin ilman matriisia. (Liite 1.)

Testit SPE 83–85 tehtiin neste-nesteeuutto näytteenkäsittelyn jälkeen, jossa näytteen pH muutettiin lopussa 0,5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ :lla. Kiinteäfaasiuutossa käytettiin metanolia, joka ei ollut LCMS-laatuista. (Liite 1.)

Testissä 83 kiinteäfaasiuutto aloitettiin alustamalla patruuna metanolilla ja vedellä. Vastaioni vaihdettiin lisäämällä aluksi 5 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  ja sen jälkeen 0,05 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Vastaionin vaihdoksen jälkeen pipetoitiin näyte ja imeytettiin se absorbenttiin. Matriisi pestiin metanolilla ja metanoli huuhdeltiin pois vedellä. Näyteviali asetettiin paikoilleen ja analyytit huuhdeltiin 0,1 M TFA:lla patruunasta vialiin. (Liite 1.)

Kiinteäfaasiuutossa testeissä 84 ja 85 testattiin TFA:n määrän vaikutusta analyyttien eluoitumiseen. Testissä 85 TFA:n määrä vähennettiin. Testit tehtiin muilta osin samalla tavalla. Alustettiin patruuna metanolilla ja vedellä. Vastaioni vaihdettiin lisäämällä 5 %

NH<sub>4</sub>OH ja emäs pestiin pois vedellä. Näyte pipetoitiin putkeen ja imeytettiin absorbenttiin. Matriisi pestiin metanolilla ja metanoli huuhdeltiin pois vedellä. Näyteviala asetettiin paikoilleen ja analyytit huuhdeltiin 0,1 M TFA:lla. (Liite 1.)

Testeissä 88 ja 89 määritettiin asetonitriliin soveltuvuutta matriisin pesuun kiinteäfaasiuutossa. Testissä 88 matriisi pestiin pois metanolilla ja testissä 89 asetonitrilillä. Molemmissa testeissä tehtiin rinnakkaismääritykset ja käytettiin vain LCMS-laatuksia liuoksia. Kiinteäfaasiuutto suoritettiin muilta osin samalla tavalla kuin testissä 85, käyttäen pienempää TFA:n määrää. Testi 90 suoritettiin samalla tavalla kuin testi 89 muuttaen vai näyttemäärän pipetointia pienemmäksi. (Liite 1.)

Kiinteäfaasiuuton testissä 91 TFA:n lisäys tehtiin TFA:n vesi-asetonitrili-(80:20) liuoksella. Mitattiin pesuliuoksen koostumus ja käytettiin pienemmän näyttemäärän pipetointia. Kiinteäfaasiuutto aloitettiin alustamalla patruuna metanolilla ja vedellä. Vastaioni vaihdettiin lisäämällä 5 % NH<sub>4</sub>OH ja emäs huuhdottiin pois vedellä. Näyte pipetoitiin putkeen ja imeytettiin absorbenttiin. Matriisi pestiin pois metanolilla ja pesuliuosta varten vaihdettiin jätteenastian tilalle näyteviala. Pesuliuoksesta haluttiin tutkia mahdollinen analyyttien siirtyminen. Huuhdottiin metanoli pois vedellä. Lisättiin 0,08 M TFA:n vesi-asetonitrili (80:20) -liuosta ja imeytettiin se hitaasti absorbenttiin. Vaihdettiin näyteviala paikoilleen ja näyte eluoiitiin 0,08 M TFA:n vesi-asetonitrili (80:20) -liuoksella. (Liite 1.)

#### 4.5.3 Vesipohjaisten näytteiden esikäsittely

Vesipohjaisille näytteille näytteenkäsittely oli yksinkertaisempi. Näytteitä laimennettiin eluentilla tarpeen mukaan. Kiintoainetta olevat näytteet sentrifugisoitiin, ja niistä otettiin kirkas neste näytteenkäsittelyyn. Laimennos tarpeen mukaan pipetoitiin ensiksi eluentia tyhjään astiaan ja sen jälkeen ISTD-työliuosta. Sekoitettiin vorteksoimalla ja pipetoitiin näyte laimennos tarpeen mukaan astiaan, pienet näyttemäärät punnittiin. Sekoitettiin vorteksoimalla ja suodatettiin näyte 2 ml:n näytevialiin.

Testejä tehtiin eri näytteillä eri laimennuskertoimilla. Tarkoituksena oli saada laimennuskertoimet, joilla analyyttien intensiteetit olivat mittausrajojen sisällä. Laimennoksen suuruus riippui näytteen alkuperästä. Useimmista näytteistä tiedettiin niiden pitoisuus suurin piirtein, jolloin laimennoskerrointa näille näytteille voitiin pitää vakiona. Analysointituloksista nähtiin näytteiden pitoisuudet, ja jos pitoisuudet eivät olleet rajojen sisällä, voitiin näytettä uudestaan laimentaa eri kertoimella.

#### 4.6 Emäksen vaikutus ionisaatioon

B-ajoliuoksen avulla pyrittiin parantamaan analyyttien ionisaatiota ennen massaan syöttöä. Lisäämällä emästä pyrittiin parantamaan analyyttien negatiivisten ionien määrää. B-ajoliuos pumpattiin T-liitososaan, josta se virtaa ionilähteeseen. Komponentteina käytettiin isopropanolia ja 25 % ammoniakkin vesiliuosta. B-ajoliuoksen vaikutusta testattiin vaihtamalla ammoniakkin pitoisuutta isopropanolissa 0,2–1 %.

#### 4.7 Koronaneulan vaikutus

Ionisaation parantamista varten testattiin Shimadzu laitteen DUIS-ominaisuutta. ESI- ja koronaneulan yhteisvaikutusta testattiin seuraamalla happojen intensiteettejä. Laitteeseen syötettiin happoseoksia ja seurattiin reaaliaikaisesti massalukujen intensiteettejä. Ominaisuuden toimivuuden testaamiseen ei käytetty paljoa aikaa. Happoseostestien tulosten perusteella intensiteetit eivät nousseet, jolloin huomattavaa ionisaation parannusta ei tapahtunut. Koronaneula poistettiin käytöstä ja menetelmän kehitystä jatkettiin pelkällä sähkösumutusionisaatiolla.

#### 4.8 Kalibointi

Kalibointi tehtiin kalibrintisuorien avulla käyttäen seitsemää tasoa. Kalibrintiliuokset valmistettiin deaktivoituihin vialeihin, pitkäaikaisen säilytysmahdollisuuden takia.

Alustava kalibrintiliuos tehtiin pipetoimalla seitsemään 4 ml:n vialiin 2,5 mM TFA-eluenttia. Ensimmäiseen vialiin lisätään happoseosta, joka on tehty puhtaista happojen kantaliuoksista, sisältäen kaikki tutkittavat hapot. Ensimmäisestä vialista pipetoitiin seuraavaan vialiin, jolloin lisätyn seoksen pitoisuus laimenee. Näin jatkettiin viimeiseen seitsemänteen tasoon.

Seuraava kalibrintiliuos tehtiin happoseoksista, joiden kantaliuoksissa liuottimena käytettiin Milli-Q-vettä, poikkeuksena huonosti liukenevat hapot. Näissä käytettiin ACN:vesi 50:50 suhteessa olevaa liuotinta. Seitsemään 4 ml:n vialiin pipetoitiin 5 mM suolahappo ja 7,5 % ACN:ää sisältävää eluenttia. Ensimmäiseen vialin pipetoitiin happoseosta ja



siitä pipetoitiin seuraavaan laimentaan happoseoksen pitoisuutta. Näin jatkettiin viimeiseen seitsemänteen vialiin.

Kalibroitiliuosten tekoa jatkettiin lisäämällä kalibrointiin sisäistä standardia. Happoseoksen teossa edelleen liuottimena käytettiin Milli-Q-vettä ja huonosti liukenevissa 50:50 suhteessa olevaa ACN:vesi-liuosta. Kalibroitiliuokset tehtiin samalla tavalla kuin aikaisemmin käyttäen 625  $\mu\text{M}$  suolahappoa ja 7,5 % ACN:ää sisältävää eluenttia. Sisäisen standardin työliuosta pipetoitiin jokaiseen valmiiseen tasoon saman verran.

Viimeinen kalibroitiliuos valmistettiin punnitsemalla jokainen pipetointi. Käytettävä happoseos valmistettiin käyttäen liuottimena Milli-Q-vettä ja huonosti liukenevissa hapoissa 50:50 suhteessa olevaa ACN:vesi-liuosta. Kalibroitiliuksissa liuottimena käytettiin 625  $\mu\text{M}$  suolahappoa ja 7,5 % ACN:ää sisältävää eluenttia. Sisäisen standardin työliuosta pipetoitiin saman verran jokaiseen tasoon.

Samaa kalibroitiliuosta ajettiin uudestaan perättäisinä päivinä. Tarkoituksena oli saada yhdelle tasolle mahdollisimman monta kalibrointipistettä.

## **5 Menetelmän kehityksen testien tulokset**

Testien tulokset käytiin vastaavan tutkijan kanssa läpi ja niiden perusteella parannettiin menetelmän toimivuutta ja optimoitiin laitteen toiminta mahdollisimman monelle analyysille. Taulukoissa 9 ja 10 on lueteltuna analyyttien retentioajat, m/z-suhteet sekä sisäisten standardien retentioajat suolahapon ollessa eluenttina.

Taulukko 9. Analyyttien retentiot ja m/z-suhteet.

Yhdiste	m/z	Retentio (min)
Muurahaishappo	45,00	13,3
Etikkahappo	59,00	15,0
Oksoetaanihappo	73,00	9,3
Hydroksietaanihappo	75,00	12,2
Propaanihappo	73,00	17,0
2-Oksopropaanihappo	87,00	7,5
2-Hydroksipropaanihappo	89,00	12,5
Butaanihappo	87,00	19,7
2-Metyylipropaanihappo	87,00	18,6
Pentaanihappo	101,00	24,8
3-Metyylibutaanihappo	101,00	21,5
Heksaanihappo	115,00	33,0
Galakturonihappo	193,10	8,8
Glukuronihappo	193,10	8,0
Propaanidihappo	103,00	8,4
Cis-buteenidihappo	115,10	6,9
Trans-buteenidihappo	115,10	10,6
Butaanidihappo	117,10	11,7
Hydroksibutaanidihappo	133,10	9,4
Metyleenibutaanidihappo	129,10	12,1
Pentaanidihappo	131,10	13,0
2-Oksopentaanidihappo	145,10	7,0

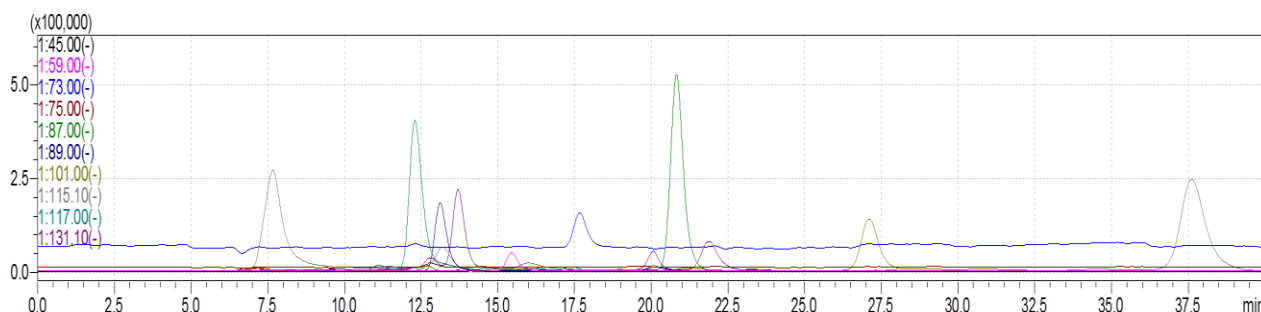
Taulukko 10. Sisäisten standardien retentio.

Sisäinen standardi	Retentio (min)
Etikkahappo	15,0
Propaanihappo	16,9
Natrium L-laktaatti	12,4
Butaanihappo	19,4
Pentaanihappo	24,2
Heksaanihappo	32,1
Butaanidihappo	11,7

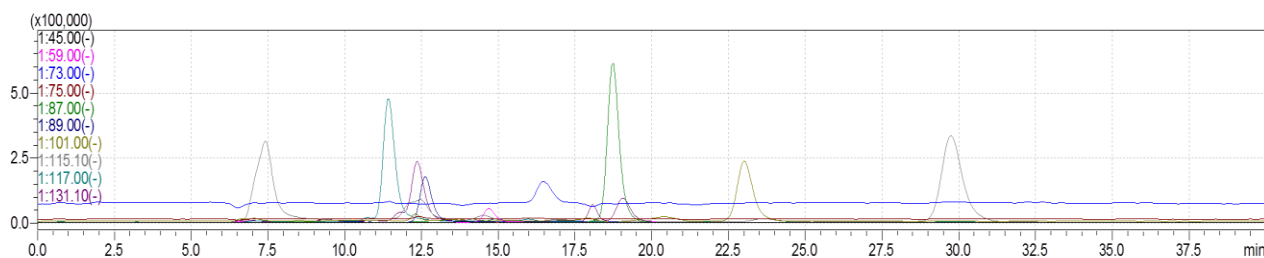
## 5.1 Ajoliuostestien tulokset

Ajoliuostestien perusteella parhaat tulokset saatiin suolahappokoostumuksesta käyttäen reagenssina 30 % suolahappoa. Suolahapolla saatiin vähennettyä analyyttien taustaa jota TFA:ta käyttäessä havaittiin. Suolahapon aiheuttamaa supressiota ionisaatiossa kontrolloitiin analyyttien sisäisten standardien avulla. Suolahaposta mahdollisesti johtuvaa korroosiota ei menetelmän kehityksen aikana havaittu. Suolojen muodostuminen ionilähteeseen estettiin pyyhkimällä ionilähde isopropanoli-vesiseoksella päivittäin. Suolahapon pitoisuuden testaamisessa paras tulos saatiin pitoisuuden ollessa 625  $\mu\text{M}$ , tämä takasi menetelmälle riittävän herkkyuden mutta heikensi joidenkin happojen määrittämistä.

Orgaanisen komponentin vaikutukset testattiin suolahappojoliuoksella. Tarkoituksena oli saada analyytit nopeammin retentoitumaan, varsinkin heksaanihapon osalta, jonka retentioaika oli lähemmäs 60 min. ACN:n määrän ollessa 15 % ja 20 % analyyttien piikit kasaantuivat toisiinsa kiinni, jolloin resoluutio kärsi liikaa. ACN:n määrä 5 %:ssa tuotti hyviä tuloksia, mutta 10 %:ssa resoluutio oli huonoa. Lukujen välistä haarukkaa käytettiin paremman resoluution testaamiseksi. Paras tulos saatiin 7,5 %:ssa, jolloin alussa retentoituvien analyyttien resoluutio ei kärsinyt ja heksaanihapon retentio tapahtui 33 minuutin kohdalla. Ajoliuos valmistettiin täyttämällä noin 2/3 säilöpullosta vedellä, lisättiin ACN mittalasilla ja pipetoitiin tarvittava määrä 30 % suolahappoa dekantteriin. Dekantterista kaadettiin suolahappo säilöpulloon ja huuhdeltiin vedellä, säilöpullo täytettiin vedellä merkkiin. Kuvissa 5 ja 6 on esiteltynä ACN:n vaikutukset retentioon.



Kuva 5. Analyyttien retentiot ACN:n määrän ollessa 5 %



Kuva 6. Analyyttien retentiot ACN:n määrän ollessa 10 %

## 5.2 Kantaliuosten valmistus

Kantaliuosten valmistuksessa päätettiin lopullisena liuottimena käyttää vettä. Heksaa-nihapon ja trans-buteenidihapon huonon liukenemisen takia käytettiin liuottimena ACN:vesi-seosta 50:50 suhteessa. Hapot itsessään sekä kylmässä säilyttäminen es-täisivät mahdollisesti syntyvät kasvustot. Kantaliuoksia käyttäessä annettiin niiden ta-saantua huoneenlämpöiseksi. Puhdasaineiden punnitusmäärät saatiin arvioitua mitta-usten tulosten perusteella sopiviksi. Analyytit, joiden puhdasaineet olivat kiinteitä, pun-nittiin 10–20 mg erillisiin 4 ml:n vialeihin. Vialeihin lisättiin 4 ml liuotinta ja sekoitettiin vorteksoimalla. Nestemäisillä puhdasaineilla ennen punnitusta lisättiin 4 ml liuotinta ja pipetoitiin puhdasainetta Pasteur-pipetillä gravimetrisesti 15–20 mg. Poikkeuksena muurahaishappoa punnittiin noin 200 mg, etikkahappoa noin 150 mg ja oksoetaani-happoa, hydroksietaanihappoa, butaanihappoa ja 2-metyylipropaanihappoa noin 50 mg. Taulukossa 11 on esitetty puhdasaineiden punnitukset ja liuottimet sekä työliuok-sen pipetointimäärät.

Taulukko 11. Analyyttien kantaliuosten punnitus ja työliuoksen pipetointi [11].

Yhdiste	Puhdasaineen punnitus (mg)	Kantaliuoksen liuotin	Kantaliuosta työliuokseen
Muurahaishappo	noin 200	Vesi	250 µl
Etikkahappo	noin 150	Vesi	250 µl
Oksoetaanihappo	noin 50	Vesi	250 µl
Hydroksietaanihappo	noin 50	Vesi	250 µl
Propaanihappo	15 - 20	Vesi	500 µl
2-Oksopropaanihappo	10 - 20	Vesi	350 µl
2-Hydroksipropaanihappo (maitohappo)	10 - 20	Vesi	350 µl
Butaanihappo	noin 50	Vesi	200 µl
2-Metyylipropaanihappo	noin 50	Vesi	200 µl
Pentaanihappo	15 - 20	Vesi	600 µl
3-Metyylibutaanihappo	15 - 20	Vesi	600 µl
Heksaanihappo	15 - 20	Vesi:ACN 1:1	300 µl
Galakturonihappo	10 - 20	Vesi	10 µl
Glukuronihappo	10 - 20	Vesi	10 µl
Propaanidihappo	10 - 20	Vesi	100 µl
Cis-buteenidihappo	10 - 20	Vesi	10 µl
Trans-buteenidihappo	10 - 20	Vesi:ACN 1:1	100 µl
Butaanidihappo	10 - 20	Vesi	40 µl
Hydroksibutaanidihappo	10 - 20	Vesi	10 µl
Metyleenibutaanidihappo	15 - 20	Vesi	40 µl
Pentaanidihappo	10 - 20	Vesi	40 µl
2-Oksopentaanidihappo	10 - 20	Vesi	10 µl

### 5.3 Sisäisten standariden valmistus

Kantaliuosten puhdasaineiden punnitusmäärät ja työliuoksen pipetointimäärät säädettiin sopiviksi mittaustulosten perusteella. Tarkat pitoisuudet laskettiin taulukkolaskentaohjelman avulla. Taulukkoon 12 on määritetty lopulliset ISTD:n punnitusmäärät, kantaliuoksien liuottimet ja pipetointimäärät työliuokseen.

Taulukko 12. Sisäisten standardien kantaliuoksen ja työliuoksen valmistus [11].

Sisäinen standardi	Puhdasainetta mg	Kantaliuoksen liuotin	Kantaliuosta IS -työliuokseen
Etikkahappo	17 - 22	Vesi	950 µl
Propaanihappo	10 - 15	Vesi	950 µl
Natrium L-laktaatti	noin 10	Vesi	200 µl
Butaanihappo	12 - 17	Vesi	200 µl
Pentaanihappo	15 - 20	Vesi	200 µl
Heksaanihappo	noin 15	Vesi:ACN 1:1	200 µl
Butaanidihappo	noin 15	Vesi	50 µl

#### 5.4 Öljypohjaisten näytteiden neste-nesteuutto

Öljypohjaisten esikäsittelytestien tulosten perusteella tehtiin näytteiden esikäsittelyn menettelyohje neste-nesteuutolle. Näytemäärä määräytyy näytetyypin mukaan, kuitenkin 20–400 mg. Punnitusmäärät vaikuttavat happojen pitoisuuksiin, ja joillakin näytetyypeillä liian suuri punnitusmäärä nostaa intensiteetit yli mittausalueen. Näytteen lämmitystesteissä ei huomattu suuria eroja ajan vaikutuksesta 60 °C:ssa. Edestakaisen lämmittämisen ja jäähdyttämisen vaikutusta näytteen happoihin ei testattu, joten lämmittämistä tarvittaessa suositellaan maksimissaan 60 min 60 °C:ssa. Sisäisen standardin lisääminen 60 µl:aan paransi analyyttien vasteita. Sisäinen standardi lisätään jäähtyneeseen näytteeseen gravimetrisesti. Inkubointi ei kasvattanut analyyttien pitoisuutta. Emäksen lisäyksellä yritettiin saada poolisempien analyyttien parempaa jakaantumista kloroformifaasista vesifaasiin. Ammoniakinvesiliuoksen 0,05 % lisäys neste-nesteuuttoon lisäsi joidenkin happojen vasteita huomattavasti. Tietyllä näytteellä heksaanihapon intensiteetti voi jopa nousta mittausalueen ulkopuolella sen korkean pitoisuuden takia näytteessä. Ammoniakkivesiliuoksen pitoisuuden ollessa 0,005 %, vasteet eivät kasvaneet. Ammoniakin vesiliuoksen lisäystä suositellaan käytettäväksi vain, jos mittausherkyys ei riitä.

Liuottimien vaikutusta testattiin kolmella eri liuottimella. Liuottimien erot eivät olleet suuria. Kokonaisuutena huonoin tulos saatiin kloroformista, johon oli lisätty stabilisaattorina etanolia. Kyseillä liuottimella suurimmalle osalle analyyteistä mitattiin matalimmat intensiteetit näytteistä sekä nollanäytteistä. Dikloorimetaanilla saatiin suuremmaksi osaksi parhaita intensiteettejä, jolloin sillä saavutettiin paras mittausherkyys. Intensiteettien

ero ei kuitenkaan ollut merkittävä verrattuna kloroformiin, jossa stabilisaattorina oli amyleenit. Tästä johtuen päätettiin liuottimeksi valita kloroformi stabilisaattorina amyleenit. Lisäksi klorofomia pidettiin käytännöllisempänä kuin dikloorimetaani sen kiehumispisteen ollessa korkeampi. Kloroformin pipetointimääräksi määrytyi 800 µl, maksiminäyttemäärän tapauksessa kloroformin määrä olisi sama kuin näytteen, veden ja sisäisen standardin yhteismäärä.

Liuottimen lisäyksen jälkeen, katsottiin hyväksi sekoittaa näytettä vorteksilla, kunnes se oli kokonaan liuennut. Liukenemisen jälkeen sentrifugoitiin näytettä 10 s ja lisättiin 350 µl vettä. Sekoittumisen varmistamiseksi vorteksoitiin näytettä nopeudella 7 – 8 noin 30 s ajan. Faasien erottumista varten sentrifugoitiin näytettä 5 min 12 000 rpm:llä. Ylempi eli vesifaasi pipetoitiin näytteensyöttäjän pulloon. Pipetointimääränä käytettiin noin 200 µl ja pienen määrän takia käytettiin kavennettuja näytepulloja. Taulukoissa 13 ja 14 on esitetty eri näytetyypin punnitusmäärä sekä neste-nesteuuton menetelmäohjeen vaiheet.

**Taulukko 13. Näytetyyppien punnitusmäärät [11].**

Näytetyyppi	Punnitusmäärä (mg)
Happopitoiset palmuöljy jäännökset	50 - 100
Palmu rasvahappo tisle	100 - 200
Palmuydinöljy	400
Muut öljyt	400

**Taulukko 14. Neste-nesteuuton vaiheet [11].**

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	20 - 400 mg
2	ISTD lisäys	60 µl
3	Kloroformi	800 µl
4	Liuotus vorteksoimalla	Tarpeen mukaan
5	Sentrifugointi, fast spin	10 s
6	MilliQ	350 µl
7	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
8	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
9	Ylemmän faasin siirto	200 µl

Laadun tarkkailu vedelle ja kloroformille aloitettiin mittaamalla Milli-Q-vettä sekä nollanäytettä näytemittauksien ohella.

### 5.5 Vesipohjaisten näytteiden esikäsittely

Vesipohjaisten näytteiden esikäsittelyssä testattiin lähinnä näytteiden laimennoskertoimia. Näytteissä olevien analyyttien pitoisuuksien vaihtelun takia testattiin erilaisia laimennoksia. Testeissä huomattiin laimennoksen vähentävän matriisiefektin vaikutusta, mikä häiritsee varsinkin niiden analyyttien määrittystä, joilla ei ole omaa sisäistä standardia. Näiden analyyttien osalta matriisia poistettiin laimentamalla näytteitä riittävästi mutta kuitenkin säilyttämällä signaali. Sisäisen standardin pitoisuutta pidettiin vakiona tiettyyn laimennoskertoimeen asti. Tämän kertoimen jälkeen sisäistä standardia pipetoitiin laimennoskertoimen verran. Tarkoituksena oli pitää sisäisen standardin suhde kokonaistilavuuteen vakiona. Tiettyjä näytteitä jouduttiin laimentamaan 500-kertaisesti, jotta analyytit eivät ylittäisi mittausaluetta. Joidenkin näytetyyppien pitoisuuksista ei ollut mitään tietoa, jolloin käytettiin 200 lähtökohtaisena laimennoskertoimena. Laimennostestien avulla tehtiin seitsemän laimennoskerrointa sisältävä taulukko. Tietyille näytetyypeille saatiin selvittyä vakiokerroin, jota voitiin käyttää näytetyypin kohdalla. Laimentaminen aloitettiin pipetoimalla eluenttia ensin laimennossuhteen mukaisesti. Tämän jälkeen sisäisen standardi pipetoitiin taulukon mukaan ja sekoitettiin vorteksoimalla. Näytettä pipetoitiin laimennossuhteen mukaisesti ja sekoitettiin vorteksoimalla. Ennen laitteeseen injektointia, suodatettiin näyte näytteesyöttäjän pulloon. Laadun tarkkailu tehtiin nollanäytteen määrittelyllä näytemittauksen ohella. Taulukossa 15 on esitettyä vesipohjaisten näytteiden laimennussuhteita.

**Taulukko 15. Vesipohjaisten näytteiden laimennussuhteita [11].**

Laimennuskerroin	Näytettä	Eluenttia	ISTD-työliuos	Astia	Kokonaistilavuus
~1	1 ml	ei	50 µl	2 ml eppendorf	1,05 ml
~10	100 µl	900 µl	50 µl	2 ml eppendorf	1,05 ml
~20	50 µl	950 µl	50 µl	2 ml eppendorf	1,05 ml
~50	20 µl	1,0 ml	50 µl	2 ml eppendorf	1,07 ml
~100	20 µl	2,0 ml	100 µl	4 ml vial	2,12 ml
~200	20 µl	3,8 ml	200 µl	4 ml vial	4,02 ml
~500	20 µl	merkkiin	500 µl	10 ml mittapullo	10 ml



## 5.6 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutolla saatiin matriisia poistettua näytteistä mutta hävitettiin myös osa analyyteistä. Saantoprosentit osalla analyyteistä olivat huonoja kiinteäfaasiuuton vaikutuksesta. Mahdollisesti osa analyyteistä jäi vielä kiinteäfaasiputkeen eikä eluoitunut eluentin mukana. Pesuliuos myös mitattiin, tarkoituksena tarkkailla mahdollisesti pesun aikana huuhtoutuvia analyyttejä. Osa analyyteistä huuhtoutui pesuliuoksen mukana, kun taas osasta oli vain pieniä jäämiä. Taulukoissa 16, 17 ja 18 on esitelty testeissä saadut saantoprosentit osalle analyyteistä. Kiinteäfaasiuutosta luovuttiin näytteidenkäsittelyssä, koska sen saantoa ei saatu riittävän hyväksi.

**Taulukko 16. Ensimmäisen kiinteäfaasiuuton näytteen ja referenssinäytteen saantoprosentit.**

Yhdiste	# 1	# 3
Muurahaishappo	32 %	44 %
Etikkahappo	29 %	37 %
Propaanihappo	45 %	64 %
Butaanihappo	36 %	49 %

Testissä 83 vastaionin vaihdos tehtiin pelkän emäksen avulla, kun taas testeissä 84 ja 85 emäs huuhdottiin vedellä pois. Testissä 85 käytettiin myös pienempää TFA:n määrää. (Taulukko 17.)

**Taulukko 17. Kiinteäfaasiuutto testien # 83 – 85 saantoprosentit.**

Yhdiste	# 83	# 84	# 85
Muurahaishappo	31 %	45 %	37 %
Etikkahappo	25 %	39 %	36 %
Propaanihappo	55 %	37 %	47 %
Butaanihappo	49 %	41 %	13 %

Testissä 88 käytettiin pesuliuoksena metanolia ja testissä 89 ja 90 asetonitriliä. Pienempää näytemäärän pipetointia käytettiin testissä 90. (Taulukko 18.)

**Taulukko 18. Kiinteäfaasiuutto testien saantoprosentit.**

Yhdiste	#88-1	#88-2	#89-1	#89-2	#90-1	#90-2	#91	Pesuliuos
Muurahaishappo	26 %	22 %	43 %	36 %	47 %	49 %	30 %	2 %
Etikkahappo	33 %	26 %	45 %	43 %	62 %	70 %	14 %	1 %
Propaanihappo	49 %	49 %	70 %	56 %	77 %	73 %	32 %	52 %
Butaanihappo	44 %	44 %	20 %	24 %	28 %	25 %	-	-

### 5.7 Emäksen vaikutus ionisaatioon

Ammoniakin pitoisuuden vaikutusta analyyttien ionisaatioon seurattiin intensiteettien avulla. Parhaat tulokset saatiin ammoniakin pitoisuuden ollessa 0,2 %. B-ajoliuos valmistettiin täyttämällä säiliöpullo isopropanolilla merkkiin ja pipetoimalla tarvittava määrä lasisella mittapipetillä 25 % ammoniakin vesiliuosta.

### 5.8 Kalibrointi

Kalibroinnin toimivuutta seurattiin päivittäisillä ajoilla samasta kalibrointiliuoksesta. Rinnakkaisilla ajoilla seurattiin analyyttien mahdollista hajoamista liuoksessa sekä laitteen toimivuutta. Kalibroinnissa tasoja oli seitsemän ja käytettiin toisen asteen sovitusta ( $y = ax^2 + bx + c$ ), jota ei pakotettu nollaan. Painokertoimena käytettiin  $1/x^2$ , koska se tuotti parhaimman tarkkuuden kalibrointitasoille. Osalta analyyteistä poistettiin korkein tai matalin taso, vasteen ollessa liian pieni tai signaalin ollessa saturoitunut. Tasojen vähimmäismääränä käytettiin kuutta tasoa. (Liite 6.) Analyytin pitoisuuden laskennassa sovellettiin kaavaa 2.

### 5.9 Integrointi

Analyyttien piikkien integroinnit tehtiin manuaalisesti, jotta ne olisivat johdonmukaisia. Analyyteille tehtiin integrointiohjeet, jotta johdonmukaisuus säilytettäisiin tulevaisuudessa määrityksissä. Automaattisen integroinnin parametreja ei saatu sopiviksi kaikkien analyyttien määrittämiseksi. Heksaanihapon ja metyylibutaanihapon isomeerit otettiin huomioon integroinnissa. Heksaanihapon isomeerit sisällytettiin heksaanihapon piikkiin ja metyylibutaanihapon isomeerit metyylibutaanihapon piikkiin.

## 6 Validoinnin tulokset

Validointia varten näytteenkäsittely ja mittaukset suoritettiin kahden viikon sisällä käyttäen kahta näytematriisia. Kalibrointisuoria ajettiin kuutena päivänä. Validointinäytteenä öljypohjaisille matriisille käytettiin happopitoista palmuöljyn tähdettä. Näytteenkäsittelyt ja mittaukset teetettiin kahdella eri henkilöllä luotettavuuden parantamiseksi. Bioöljynäytteestä määritettiin 15 analyyttia ja käytettiin neljää pitoisuustasoa. Nollatasona käytettiin

tettiin alkuperäistä näytettä ja tasot 1–3 tehtiin lisäysmenetelmällä lisäämällä analyyttejä tunnetuilla pitoisuuksilla alkuperäiseen näytteeseen.

Käyttäen kahta eri henkilöä näytematriisin pitoisuustasot valmistettiin samana päivänä ja määritykset tehtiin erillisinä päivinä. Määritykset koostuivat näytteenkäsittelystä ja mittauksesta. Sisäisen standardin työliuosta valmistettiin kaksi, eri henkilöiden tekemänä luotettavuuden parantamiseksi. Määrityksissä bioöljynäytteitä punnittiin noin 75 mg.

## 6.1 Toistettavuus ja sisäinen uusittavuus

Bioöljynäytteelle toistettavuus määritettiin tekemällä kolme rinnakkaismääritystä päivässä jokaiselle tasolle neljänä eri päivänä. Kolmannen päivän määritykset tehtiin eri henkilöllä ja käyttäen eri sisäisen standardin työliuosta. Oksoetaanihakolla ei nollatasolla havaittu signaalia, mahdollisesti johtuen analyytin pienestä pitoisuudesta tai analyytin hajoamisesta. Oman sisäisen standardin omaavien analyyttien toistettavuus oli hyvää. Toistettavuudet näillä analyyteillä jäivät alle 5 %, poikkeuksena maito- ja butaanidihappo. Maitohapolla kolmantena päivänä nollatasolla nähdään suuri nousu muihin päiviin verrattuna, mikä mahdollisesti kertoo sinä päivänä suuremmasta satunnaisesta virheestä. Butaanidihakolla toistettavuus on 10 % paikkeilla. (Liite 3.)

Semi-kvantitatiivisille analyyteille tulokset olivat huonompia mutta silti toistettavia. 2-metyylipropani-, 3-metyylibutaani- ja hydroksietaanihakolla toistettavuudet olivat alle 10 %. Muilla toistettavuudet vaihtelivat päivittäin 1–25 %. (Liite 3.)

Sisäinen uusittavuus laskettiin suhteellisen keskihajonnan avulla. Kvantitatiivisille analyyteille sisäinen uusittavuus oli 0,1–7 %:n välillä paitsi maito-, heksaani- ja butaanidihakolla se oli 3–15 %:n välillä. (Liite 4.)

Semi-kvantitatiivisille analyyteille sisäinen uusittavuus vaihteli suuresti analyyttien välillä. Muurahaishapolla saatiin parhaimmat tulokset, 10 %:n luokkaa. 2-metyylipropani- ja 3-metyylibutaanin tulokset vaihtelivat tasosta riippuen 7–16 % välillä. Muilla analyyteillä sisäinen uusittavuus vaihteli 4–32 % tasosta riippuen. Tämä oletettavasti johtuu sisäisen standardin puutteesta, jolloin matriisieffektit vaikuttavat mittauksissa tuloksiin. (Liite 4.) Oksoetaanin sisäinen uusittavuus jätettiin määrittämättä sen

epästabiilisuuden takia. Oksoetaanihapon pitoisuus putosi systemaattisesti validoinnin aikana viitaten analyytin hajoamiseen.

## 6.2 Oikeellisuus

Oikeellisuus määritettiin samoista mittaustuloksista kuin toistettavuuskin. Oikeellisuus laskettiin analyyttien saantojen avulla. Oksoetaanihapolle ei laskettu oikeellisuutta, nollatason signaalin puutteen vuoksi. Kvantitatiivisille analyyteille saannot olivat hyviä. Saantoprosentit olivat 95–105 % luokkaa, poikkeuksena maitohappo. Maitohapolla saanto oli noin 85 %. (Liite 5.)

Semi-kvantitatiivisilla saantoprosentit olivat 80–130 % luokkaa, poikkeuksena hydroksibutaanidihappo. Hydroksibutaanidhapolla saanto jäi noin 60 %:iin. Semi-kvantitatiivisilla saannot ovat kohtuullisia mutta vaihtelevuus on suurta. Tämä johtuu pitkälti oman sisäisen standardin puuttumisesta. (Liite 5.)

## 6.3 Kalibroinnin tarkkuus

Laitteen ohjelma laskee kalibrintipisteiden tarkkuuden vertaamalla mitattua ja määritettyä pitoisuutta. Tarkkuus ilmoitetaan taulukossa kalibrintipisteen kohdalla prosenteissa. Prosenttiarvoja käytettiin hyväksi kalibroinnin tarkkuuden määrittämisessä. Kalibrintipisteiden tarkkuusarvot taulukoitiin ja asetettiin tarkkuudelle hyväksymisrajat. Kalibrintipisteitä pidettiin hyväksyttävinä, ne olivat 80 – 120 % välillä (Liite 7). Kalibroinnin pätevyyttä seurataan referenssinäytteellä, joka on validointinäytteiden nollataso. Uusintakalibrointi tehdään, jos referenssinäytteen kvantitatiivisia analyyttejä ei saada hyväksyntärajoihin tai sisäisen standardin puhdasaine-erä vaihdetaan. Referenssinäytteen hyväksymisrajat asetettiin sisäisen uusittavuuden arvoilla luottamustasolla 95 % ja 99,7 %.

## 6.4 Määritysraja

Määritysraja laskettiin käyttäen hyväksi signaali-kohinasuhdetta (S/N). Bioöljynäytteenä käytettiin nollatasonnäytettä ja määränä 75 mg. Määritysrajan laskemiseksi käytettiin kaavaa 8. Laitteen ohjelman antama pitoisuus analyyteille jaettiin sille ilmoitetulla

S/N:llä. Jakolaskusta saatu tulos kerrottiin 5:llä, jolloin saadaan S/N:n ollessa 5 analyytin pitoisuus. Tätä pitoisuutta pidettiin analyytin mittaustalarajana. Analyyttien määrittämissarajat on esitetty taulukossa 19.

$$\text{pitoisuus } S/N:n \text{ ollessa } 5 = \frac{\text{Analyytin annettu pitoisuus}}{\text{ohjelman antama } S/N} * 5 \text{ } S/N \text{ (kaava 7)}$$

**Taulukko 19. Määrittämissarajat [11].**

<b>Bioöljynäyte</b> <b>Validointidataan perustuva mittaustalaraja (LoQ, S/N = 5)</b> Perustuen 4 päivän huonoimpaan signaali/kohina-suhteeseen		
Näytteen punnittu määrä	75 mg	400 mg
Yhdiste	ppm	ppm
Muurahaishappo (C1:0)	4	0,8
Etikkahappo (C2:0)	5	0,9
Propaanihappo (C3:0)	4	0,7
Hydroksietaanihappo (C2:0-OH)	1	0,2
Butaanihappo (C4:0)	3	0,6
2-Metyylipropaanihappo (C4:0)	2	0,4
2-Hydroksi propaanihappo (C3:0-OH)	0,5	0,1
Pentaanihappo (C5:0)	7	1,4
3-Metyyli butaanihappo (C5:0)	8	1,6
Heksaanihappo (C6:0)	18	3,4
Butaanidihappo (C4:0-di)	0,2	0,03
Pentaanidihappo (C5:0-di)	0,3	0,1
Hydroksibutaanihappo (C4:0-OH-di)	0,02	0,003

## 7 Loppupäätelmät

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää yksinkertainen ja toimiva menetelmä karboksyylihappojen määrittämiseksi nestekromatografi-massaspektrometrialla vesi- ja öljypohjaisista näytteistä. Onnistuttiin kehittämään vähäisellä näytteen esikäsittelyllä toimiva menetelmä, jolla voidaan analysoida lyhytketjuisia karboksyylihappoja kvantitatiivisesti tai semi-kvantitatiivisesti. Menetelmä perustuu ioniekskluusiokromatografiaan ja massaspektrometriseen detektointiin. Sähkösumutus-ionisaatiolla saadaan pehmeästi ionisoitua analyytit vähäisellä fragmentoitumisella. Matriisiefektit saadaan huomioon otettua staabiili-isotooppileimatuilla sisäisillä standardeilla, jolloin kvantitatiivinen määrittäminen on mahdollista. Suolahapon käytöllä saatiin vähäisempi tausta analyyteille. Suolahaposta joh-

tuvaa mahdollista korroosion muodostumista tulisi seurata. Päivittäisellä huoltotoimiteella estettiin mahdollinen suolojen muodostus ja pidetään ionilähde toimintakunnossa. Validoinnilla osoitettiin ja testattiin menetelmän toimivuus. Saatu menetelmä jäi Neste Oilin tutkimusanalytiikan käyttöön. Menetelmään mahdollisia parannuksia voisi esimerkiksi olla kiinteäfaasiuuton uudelleen testaaminen käyttäen eri eluenttia kuin TFA. Opinnäytetyöprosessi tuotti paljon kokemusta ja tietoa menetelmän kehitystyöstä sekä LC-MS-laitteen käytöstä.

## Lähteet

- 1 Neste Oil. Neste Oil lyhyesti. Verkkosivusto.  
<http://www.nesteoil.fi/default.asp?path=35,52,62,2999>. Luettu 30.10.2014.
- 2 Neste Oil. Tutkimus, teknologia ja suunnittelutoiminta. Verkkosivusto.  
<http://nesteoil.fi/default.asp?path=35,52,11990,13561>. Luettu 30.10.2014.
- 3 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka, 5. – 6. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.
- 4 Harris, Daniel C. 2010. Quantitative Chemical Analysis, Eighth Edition, International Edition. New York: W. H. Freeman and Company
- 5 Shimadzu. Analytical Methods of Organic Acids. Verkkosivusto.  
<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/ltalk/54/54intro.html>. Luettu 9.11.2014.
- 6 LCMS-2020 Instruction Manual. 2013. Shimadzu.
- 7 Suomi, Johanna. 2009. Kemiallisen näytteen esikäsittely. Helsinki: Kustannus-osakeyhtiö Otava.
- 8 McMurry, John. 2012. Organic Chemistry, Eight Edition, International Edition. Brook/Cole Cengage Learning.
- 9 Kemian metrologian opas. 2005. Helsinki: MIKES, mittatekniikan keskus.
- 10 Viidanoja, Jyrki. 2014. Tutkija, Orgaaninen analytiikka, Tutkimus ja Kehitys, Kemian osasto, Tutkimusanalytiikka, Neste Oil Oyj, Porvoo. Sähköpostikeskustelut 15.3 – 14.11.2014.
- 11 Menetelmäohje. 2014. Porvoo: Neste Oilin laatujärjestelmä.
- 12 The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998. Eurachem.
- 13 Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. 1997. Helsinki: Evira.
- 14 Mäkinen, Irma, Suortti, Anna-Mari, Saares, Riitta & Niemi, Ritva. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki: Suomen Ympäristökeskus.

- 15 Neste Oil. Uusiutuva NEXBTL-diesel. Verkkosivusto.  
<http://nesteoil.fi/default.asp?path=35,52,63,310,23111,22216>. 11.11.2014. Luettu 12.11.2014.
- 16 Zafar, Salman. 2014. Biofuels from Lignocellulosic Biomass. Verkkodokumentti.  
<http://www.bioenergyconsult.com/what-is-lignocellulosic-biomass/>. 15.8.2014. Luettu 4.11.2014
- 17 Shimadzu. LCMS-2020 Single Quadrupole Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LC/MS). Verkkosivusto.  
<https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcms2020>. Luettu 4.11.2014.



## Kiinteäfaasiuuton testien vaiheet

Alkuperäinen kiinteäfaasiuutto menettely

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	MeOH	0,5 ml
2	MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	0,05 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
5	REF ja näyte	0,5 ml ja 200 µl
6	MeOH	0,5 ml
7	MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	1 ml

SPE 83

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	MeOH	0,5 ml
2	MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	0,05 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
5	REF ja näyte	0,5 ml ja 200 µl
6	MeOH	0,5 ml
7	MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	2 x 0,5 ml

SPE 84

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	MeOH	0,5 ml
2	MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	MilliQ	2 x 0,5 ml
5	Näyte	200 µl
6	MeOH	0,5 ml
7	MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	2 x 0,5 ml

SPE 85

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	MeOH	0,5 ml
2	MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	MilliQ	2 x 0,5 ml
5	Näyte	200 µl
6	MeOH	0,5 ml
7	MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	2 x 250 µl

**Kiinteäfaasiuuton testien vaiheet**

SPE 88

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	LCMS-MeOH	0,5 ml
2	LCMS-MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	LCMS-MilliQ	2 x 0,5 ml
5	Näyte	200 µl
6	LCMS-MeOH	0,5 ml
7	LCMS-MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	2 x 250 µl

SPE 89

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	LCMS-MeOH	0,5 ml
2	LCMS-MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	LCMS-MilliQ	2 x 0,5 ml
5	Näyte	200 µl
6	LCMS-asetonitrili	0,5 ml
7	LCMS-MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	2 x 250 µl

SPE 90

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	LCMS-MeOH	0,5 ml
2	LCMS-MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	LCMS-MilliQ	2 x 0,5 ml
5	Näyte	100 µl
6	LCMS-asetonitrili	0,5 ml
7	LCMS-MilliQ	0,5 ml
	Näytevialin vaihto	
8	0,1 M TFA	2 x 250 µl

SPE 91

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	LCMS-MeOH	0,5 ml
2	LCMS-MilliQ	0,5 ml
3	5 % NH <sub>4</sub> OH	0,5 ml
4	LCMS-MilliQ	0,5 ml
5	Näyte	100 µl
6	LCMS-MeOH	300 µl
	Pesupullon vaihto	
7	LCMS-MilliQ	300 µl
8	0,08 M TFA:n vesi:ACN 80:20	2 x 125 µl
	Näytevialin vaihto	
9	0,08 M TFA:n vesi:ACN 80:20	300 µl

**Neste-nesteuuton testien vaiheet**

Alkuperäinen neste-nesteuutto menettely

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 300 mg
2	Kloroformi	900 µl
3	Liuotus	
4	MilliQ (pH 9-10)	300 µl
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	3 - 7 min

NH<sub>3</sub> vaikutus 5 %

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 300 mg
2	Kloroformi	900 µl
3	Liuotus	
4	MilliQ	300 µl
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
6	Ylemmän faasin siirto	200 µl
7	5 % NH <sub>4</sub> OH	2,5 µl

NH<sub>3</sub> vaikutus 0,05 %

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 300 mg
2	Kloroformi	900 µl
3	Liuotus	
4	MilliQ	300 µl
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
6	Ylemmän faasin siirto	200 µl
7	0,05 % NH <sub>4</sub> OH	2,5 µl

NH<sub>3</sub> vaikutus 0,5 %

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 300 mg
2	Kloroformi	900 µl
3	Liuotus	
4	MilliQ	300 µl
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
6	Ylemmän faasin siirto	200 µl
7	0,5 % NH <sub>4</sub> OH	2,5 µl

## Neste-nesteuuton testien vaiheet

Testi # 86

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 300 mg
2	Kloroformi	900 µl
3	Liuotus	
4	MilliQ	300 µl
5	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
6	Ylemmän faasin siirto	200 µl
7	0,5 % NH <sub>4</sub> OH	2,5 µl
8	sekoitus	2 - 5 s

Testi # 87

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 300 mg
2	Kloroformi	900 µl
3	Liuotus	
4	MilliQ	300 µl
5	Ravistelijä, 850 rpm	5 min
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
6	Ylemmän faasin siirto	200 µl
7	0,5 % NH <sub>4</sub> OH	2,5 µl
8	sekoitus	2 - 5 s

Testi # 88-90

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 400 mg
2	Kloroformi	800 µl
3	Liuotus vorteksoimalla	n. 30 s
4	MilliQ	400 µl
5	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
5	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
6	Ylemmän faasin siirto	200 µl
7	0,5 % NH <sub>4</sub> OH	10 µl
8	sekoitus	2 - 5 s

Testi # 91

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 400 mg
2	Kloroformi	800 µl
3	Liuotus vorteksoimalla	n. 30 s
4	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
5	MilliQ	400 µl
6	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
7	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
8	Ylemmän faasin siirto	200 µl
9	0,5 % NH <sub>4</sub> OH	10 µl
10	sekoitus	2 - 5 s

**Neste-nesteuuton testien vaiheet****# 1 A**

<b>Vaihe</b>	<b>Toimenpide</b>	<b>Määrä</b>
1	Näyte	n. 400 mg
2	ISTD lisäys	60 µl
3	Kloroformi	800 µl
4	Liuotus vorteksoimalla	n. 30 s
5	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
6	MilliQ	400 µl
7	Ravistelija, 850 rpm	5 min
8	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
9	Ylemmän faasin siirto	200 µl

**# 1 B**

<b>Vaihe</b>	<b>Toimenpide</b>	<b>Määrä</b>
1	Näyte	n. 400 mg
2	ISTD lisäys	60 µl
3	Kloroformi	800 µl
4	Liuotus vorteksoimalla	n. 30 s
5	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
6	MilliQ	400 µl
7	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
8	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
9	Ylemmän faasin siirto	200 µl

**# 2 nollanäyte**

<b>Vaihe</b>	<b>Toimenpide</b>	<b>Määrä</b>
1	ISTD lisäys	60 µl
2	Kloroformi	800 µl
3	sekoitus vorteksoimalla	n. 30 s
4	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
5	MilliQ	400 µl
6	Ravistelija, 850 rpm	5 min
7	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
8	Ylemmän faasin siirto	200 µl

**# 3 A**

<b>Vaihe</b>	<b>Toimenpide</b>	<b>Määrä</b>
1	ISTD lisäys	60 µl
2	Kloroformi	800 µl
3	sekoitus vorteksoimalla	n. 30 s
4	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
5	0,05 % NH <sub>4</sub> OH	350 µl
6	Ravistelija, 850 rpm	5 min
7	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
8	Ylemmän faasin siirto	200 µl

## Neste-nesteuuton testien vaiheet

# 3 B

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	ISTD lisäys	60 µl
2	Kloroformi	800 µl
3	sekoitus vorteksoimalla	n. 30 s
4	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
5	0,005 % NH <sub>4</sub> OH	350 µl
6	Ravistelija, 850 rpm	5 min
7	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
8	Ylemmän faasin siirto	200 µl

# 1 - 6

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Näyte	n. 400 mg
2	ISTD lisäys	60 µl
3	Kloroformi	800 µl
4	Liutos vorteksoimalla	n. 30 s
5	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
6	MilliQ	400 µl
7	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
8	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
9	Ylemmän faasin siirto	200 µl

Lämmitystesti

Näyte	Kuumennus 60 °C	Aika (min)
1	Ei	-
2	Kyllä	15
3	Kyllä	30
4	Kyllä	60
5	Kyllä	120
6	Kyllä	240
7	Ei	-
8	Ei	-

# 7

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	Kloroformi	800 µl
2	MilliQ	400 µl
3	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
4	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
5	Ylemmän faasin siirto	200 µl

nollanäyte

Vaihe	Toimenpide	Määrä
1	ISTD lisäys	60 µl
2	Kloroformi	800 µl
3	Liutos vorteksoimalla	n. 30 s
4	Sentrifugointi, fast spin	2 - 5 s
5	MilliQ	400 µl
6	Vorteksointi, nopeus 7 - 8	n.30 s
7	Sentrifugointi 12 000 rpm	5 min
8	Ylemmän faasin siirto	200 µl

**Toistettavuus**

kvantitatiiviset analytit, RSD %

Etikkahappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	1,8 %	1,3 %	0,2 %	1,1 %
Taso 1	0,9 %	0,6 %	0,0 %	0,2 %
Taso 2	2,9 %	0,4 %	1,4 %	0,9 %
Taso 3	2,0 %	1,2 %	0,5 %	0,4 %

Propaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	0,7 %	0,3 %	0,2 %	1,0 %
Taso 1	0,8 %	0,4 %	0,2 %	0,2 %
Taso 2	1,5 %	0,4 %	0,8 %	0,4 %
Taso 3	1,7 %	1,3 %	0,5 %	0,2 %

Butaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	2,4 %	0,9 %	0,4 %	0,5 %
Taso 1	1,2 %	0,3 %	0,2 %	0,3 %
Taso 2	2,7 %	1,0 %	1,0 %	2,5 %
Taso 3	1,9 %	1,2 %	1,2 %	0,4 %

Pentaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	1,7 %	1,0 %	0,9 %	1,0 %
Taso 1	0,7 %	1,2 %	1,0 %	1,8 %
Taso 2	2,0 %	0,7 %	4,5 %	1,2 %
Taso 3	1,8 %	2,2 %	1,5 %	1,4 %

Heksaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	1,5 %	1,3 %	0,9 %	0,5 %
Taso 1	0,9 %	2,8 %	3,1 %	2,9 %
Taso 2	4,2 %	2,9 %	2,0 %	2,5 %
Taso 3	1,8 %	1,4 %	3,2 %	0,9 %

Maitohappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	0,9 %	1,1 %	13,6 %	0,9 %
Taso 1	1,6 %	0,9 %	0,8 %	0,7 %
Taso 2	2,3 %	1,0 %	2,9 %	1,0 %
Taso 3	3,5 %	1,2 %	0,1 %	0,6 %

Butaanidihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	2,3 %	8,1 %	10,1 %	2,1 %
Taso 1	2,0 %	1,0 %	2,9 %	8,4 %
Taso 2	2,6 %	0,6 %	1,3 %	0,9 %
Taso 3	1,9 %	0,3 %	0,6 %	0,9 %

**Toistettavuus**

semi-kvantitatiiviset analyytit, RSD %

Muurahaishappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	2,4 %	3,3 %	6,1 %	3,0 %
Taso 1	2,4 %	2,7 %	1,4 %	0,3 %
Taso 2	1,3 %	0,4 %	4,0 %	2,7 %
Taso 3	2,2 %	2,9 %	0,6 %	1,9 %

2-Metyylipropaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	3,9 %	7,7 %	4,8 %	4,4 %
Taso 1	1,9 %	0,9 %	1,9 %	1,2 %
Taso 2	3,7 %	1,0 %	2,7 %	1,2 %
Taso 3	3,1 %	0,1 %	0,6 %	2,0 %

3-Metyylibutaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	4,6 %	4,4 %	5,5 %	5,4 %
Taso 1	2,4 %	0,8 %	0,6 %	1,9 %
Taso 2	2,1 %	1,1 %	4,4 %	1,8 %
Taso 3	2,7 %	2,5 %	2,0 %	2,1 %

Oksoetaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	-	-	-	-
Taso 1	4,2 %	5,2 %	3,0 %	2,9 %
Taso 2	6,1 %	3,5 %	22,6 %	6,4 %
Taso 3	4,7 %	0,3 %	0,4 %	1,0 %

Hydroksietaanihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	7,5 %	1,8 %	11,1 %	5,2 %
Taso 1	2,7 %	1,7 %	1,7 %	2,9 %
Taso 2	2,9 %	1,8 %	3,9 %	5,0 %
Taso 3	2,9 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %

Hydroksibutaanidihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	1,8 %	12,4 %	20,6 %	5,8 %
Taso 1	6,7 %	6,8 %	10,7 %	9,4 %
Taso 2	5,5 %	3,2 %	24,5 %	13,3 %
Taso 3	2,4 %	1,0 %	1,0 %	0,9 %

Pentaanidihappo				
	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4
Taso 0	2,4 %	3,3 %	10,9 %	3,6 %
Taso 1	2,2 %	1,6 %	2,8 %	14,7 %
Taso 2	1,6 %	0,6 %	1,6 %	1,7 %
Taso 3	3,4 %	0,4 %	1,0 %	1,0 %



**Sisäinen uusittavuus luottamustasolla 95 %**

kvantitatiiviset analyytit, RSD %

<b>Etikkahappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	4,5 %
Taso 1	4,3 %
Taso 2	5,0 %
Taso 3	3,5 %

<b>Propaanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	2,2 %
Taso 1	1,6 %
Taso 2	3,6 %
Taso 3	2,6 %

<b>Butaanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	4,7 %
Taso 1	2,4 %
Taso 2	4,0 %
Taso 3	3,0 %

<b>Pentaanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	4,8 %
Taso 1	4,6 %
Taso 2	6,4 %
Taso 3	5,7 %

<b>Heksaanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	3,1 %
Taso 1	5,2 %
Taso 2	8,4 %
Taso 3	4,6 %

<b>Maitohappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	14,7 %
Taso 1	4,0 %
Taso 2	4,1 %
Taso 3	4,4 %

<b>Butaanidihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	14,8 %
Taso 1	11,6 %
Taso 2	5,6 %
Taso 3	4,9 %

**Sisäinen uusittavuus luottamustasolla 95 %**

semi-kvantitatiiviset analyytit, RSD %

<b>Muurahaishappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	10,8 %
Taso 1	7,8 %
Taso 2	9,8 %
Taso 3	9,6 %

<b>2-Metyylipropanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	16,0 %
Taso 1	7,6 %
Taso 2	8,3 %
Taso 3	8,2 %

<b>3-Metyylibutaanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	16,0 %
Taso 1	6,3 %
Taso 2	6,6 %
Taso 3	7,3 %

<b>Hydroksietaanihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	20,1 %
Taso 1	16,1 %
Taso 2	13,4 %
Taso 3	8,2 %

<b>Hydroksibutaanidihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	31,0 %
Taso 1	20,6 %
Taso 2	31,6 %
Taso 3	8,7 %

<b>Pentaanidihappo</b>	<b>Sisäinen uusittavuus</b>
Taso 0	21,5 %
Taso 1	16,1 %
Taso 2	4,4 %
Taso 3	3,9 %

## Oikeellisuus

## Kvantitatiiviset analyytit

Etikkahappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	101,1 %	2,4 %	1,2 %	3,8 %	97,4 %	104,9 %
Taso 2	101,6 %	2,0 %	1,0 %	3,2 %	98,3 %	104,8 %
Taso 3	100,2 %	1,3 %	0,6 %	2,0 %	98,2 %	102,2 %
Tasot 1 - 3	101,0 %	1,9 %	0,9 %	3,0 %	98,0 %	103,9 %

Propaanihappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	97,4 %	0,9 %	0,4 %	1,4 %	96,0 %	98,8 %
Taso 2	101,8 %	1,9 %	1,0 %	3,1 %	98,7 %	104,9 %
Taso 3	100,6 %	0,8 %	0,4 %	1,3 %	99,3 %	101,9 %
Tasot 1 - 3	99,9 %	0,9 %	0,5 %	1,5 %	98,4 %	101,4 %

Butaanihappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	97,4 %	1,2 %	0,6 %	1,9 %	95,5 %	99,2 %
Taso 2	97,3 %	0,8 %	0,4 %	1,3 %	96,0 %	98,7 %
Taso 3	94,6 %	0,8 %	0,4 %	1,3 %	93,3 %	95,9 %
Tasot 1 - 3	96,4 %	0,9 %	0,4 %	1,4 %	95,0 %	97,8 %

Pentaanihappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	97,4 %	3,4 %	1,7 %	5,5 %	91,9 %	102,8 %
Taso 2	97,0 %	2,4 %	1,2 %	3,8 %	93,2 %	100,7 %
Taso 3	102,6 %	2,5 %	1,2 %	4,0 %	98,7 %	106,6 %
Tasot 1 - 3	99,0 %	1,3 %	0,6 %	2,1 %	96,9 %	101,0 %

Heksaanihappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	90,9 %	2,6 %	1,3 %	4,2 %	86,8 %	95,1 %
Taso 2	92,8 %	3,5 %	1,8 %	5,6 %	87,2 %	98,4 %
Taso 3	99,2 %	1,5 %	0,8 %	2,4 %	96,8 %	101,6 %
Tasot 1 - 3	94,3 %	2,1 %	1,0 %	3,3 %	91,0 %	97,6 %

Maitohappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	81,0 %	2,8 %	1,4 %	4,4 %	76,6 %	85,4 %
Taso 2	86,8 %	1,0 %	0,5 %	1,6 %	85,3 %	88,4 %
Taso 3	89,3 %	1,3 %	0,7 %	2,1 %	87,2 %	91,4 %
Tasot 1 - 3	85,7 %	1,2 %	0,6 %	1,9 %	83,8 %	87,6 %

Butaanidihappo	m = 4		n = 3		min	maks
	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %		
Taso 1	98,4 %	7,1 %	3,6 %	11,3 %	87,1 %	109,7 %
Taso 2	103,2 %	2,6 %	1,3 %	4,1 %	99,1 %	107,3 %
Taso 3	101,0 %	2,6 %	1,3 %	4,1 %	96,9 %	105,1 %
Tasot 1 - 3	100,9 %	3,8 %	1,9 %	6,0 %	94,9 %	106,9 %

## Oikeellisuus

semi-kvantitatiiviset analyytit

		m = 4		n = 3	
Muurahaishappo	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %	min maks
Taso 1	90,5 %	3,3 %	1,7 %	5,3 %	85,2 % 95,7 %
Taso 2	87,8 %	3,8 %	1,9 %	6,1 %	81,7 % 93,9 %
Taso 3	79,0 %	3,5 %	1,8 %	5,6 %	73,4 % 84,6 %
Tasot 1 - 3	85,8 %	3,5 %	1,7 %	5,5 %	80,2 % 91,3 %

2-Metyyllipropaanihappo	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %	min maks
Taso 1	87,5 %	3,1 %	1,6 %	4,9 %	82,5 % 92,4 %
Taso 2	86,0 %	2,9 %	1,5 %	4,7 %	81,3 % 90,7 %
Taso 3	83,1 %	3,1 %	1,5 %	4,9 %	78,2 % 88,0 %
Tasot 1 - 3	85,5 %	2,9 %	1,4 %	4,6 %	80,9 % 90,1 %

3-Metyyllibutaanihappo	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %	min maks
Taso 1	125,4 %	3,2 %	1,6 %	5,1 %	120,3 % 130,5 %
Taso 2	125,9 %	2,8 %	1,4 %	4,5 %	121,4 % 130,3 %
Taso 3	136,5 %	4,0 %	2,0 %	6,3 %	130,1 % 142,8 %
Tasot 1 - 3	129,2 %	2,3 %	1,2 %	3,7 %	125,5 % 133,0 %

Hydroksietaanihappo	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %	min maks
Taso 1	91,3 %	11,2 %	5,6 %	17,8 %	73,5 % 109,2 %
Taso 2	104,2 %	6,3 %	3,2 %	10,0 %	94,1 % 114,2 %
Taso 3	109,5 %	4,3 %	2,2 %	6,9 %	102,6 % 116,4 %
Tasot 1 - 3	101,7 %	6,7 %	3,4 %	10,7 %	91,0 % 112,3 %

Hydroksibutaanidihappo	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %	min maks
Taso 1	47,8 %	3,3 %	1,7 %	5,3 %	42,5 % 53,0 %
Taso 2	70,3 %	5,9 %	3,0 %	9,4 %	60,9 % 79,7 %
Taso 3	76,6 %	3,2 %	1,6 %	5,0 %	71,6 % 81,6 %
Tasot 1 - 3	64,9 %	3,3 %	1,6 %	5,2 %	59,7 % 70,1 %

Pentaanidihappo	keskiarvo	keskihajonta	keskivirhe	keskivirhe 95 %	min maks
Taso 1	109,2 %	6,6 %	3,3 %	10,5 %	98,7 % 119,7 %
Taso 2	108,7 %	1,7 %	0,8 %	2,7 %	106,1 % 111,4 %
Taso 3	113,5 %	0,8 %	0,4 %	1,3 %	112,2 % 114,8 %
Tasot 1 - 3	110,5 %	2,1 %	1,1 %	3,4 %	107,1 % 113,9 %

## Kalibrointikuvaajat

$$Y = aX^2 + bX + c$$

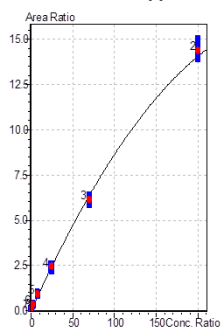
$$a = -0.000162024$$

$$b = 0.102702$$

$$c = 0.00218217$$

$$r^2 = 0.9987911 \quad r = 0.9993954$$

Muurahaishappo



$$Y = aX^2 + bX + c$$

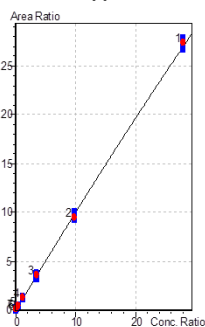
$$a = -0.00220526$$

$$b = 1.02820$$

$$c = -0.00163335$$

$$r^2 = 0.9991320 \quad r = 0.9995959$$

Etikkahappo



$$Y = aX^2 + bX + c$$

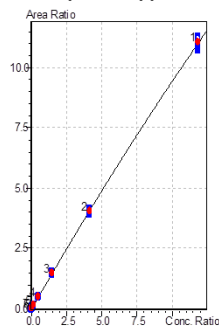
$$a = -0.00753559$$

$$b = 1.01887$$

$$c = -0.000847670$$

$$r^2 = 0.9999118 \quad r = 0.9999559$$

Propaanihappo



$$Y = aX^2 + bX + c$$

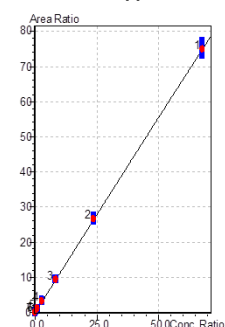
$$a = -0.000236617$$

$$b = 1.11968$$

$$c = 0.000494058$$

$$r^2 = 0.9999491 \quad r = 0.9999745$$

Butaanihappo



$$Y = aX^2 + bX + c$$

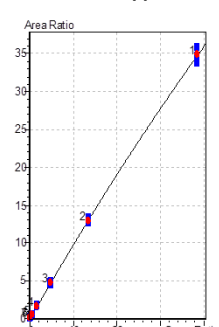
$$a = -0.00265637$$

$$b = 1.00375$$

$$c = 0.000440176$$

$$r^2 = 0.9999734 \quad r = 0.9999867$$

Pentaanihappo



2-Metyylipropaanihappo

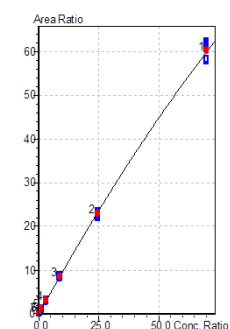
$$Y = aX^2 + bX + c$$

$$a = -0.00204807$$

$$b = 0.999676$$

$$c = 7.59657e-005$$

$$r^2 = 0.9998880 \quad r = 0.9999440$$



3-Metyylibutaanihappo

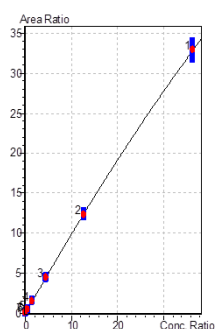
$$Y = aX^2 + bX + c$$

$$a = -0.00333791$$

$$b = 1.02333$$

$$c = 0.000655699$$

$$r^2 = 0.9999207 \quad r = 0.9999604$$



2-Hydroksipropaanihappo

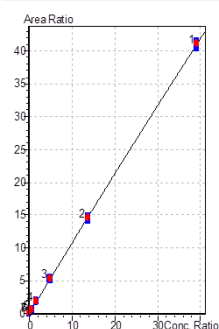
$$Y = aX^2 + bX + c$$

$$a = -0.000952340$$

$$b = 1.08395$$

$$c = 0.0335575$$

$$r^2 = 0.9999548 \quad r = 0.9999774$$



Butaanidihappo

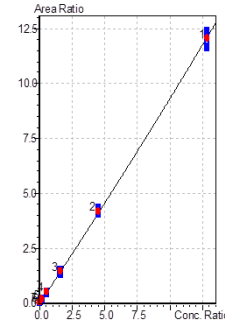
$$Y = aX^2 + bX + c$$

$$a = 0.00357937$$

$$b = 0.897765$$

$$c = 0.00555107$$

$$r^2 = 0.9999040 \quad r = 0.9999520$$



Hydroksietaanihappo

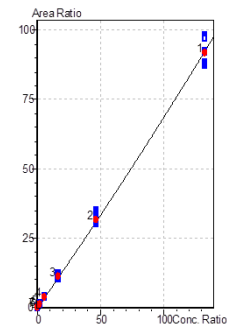
$$Y = aX^2 + bX + c$$

$$a = 0.000347404$$

$$b = 0.652388$$

$$c = -0.0254833$$

$$r^2 = 0.9995450 \quad r = 0.9997725$$

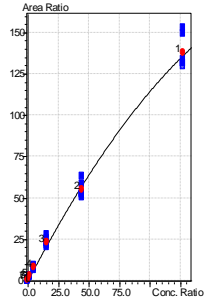


## Kalibrointikuvaajat

$$Y = aX^2 + bX + c$$

$a = -0.00275349$   
 $b = 1.42200$   
 $c = -0.0514509$   
 $r^2 = 0.9971073$   $r = 0.9985526$

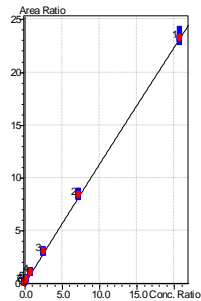
**Oksoetaanihappo**



$$Y = aX^2 + bX + c$$

$a = -0.00127084$   
 $b = 1.14509$   
 $c = 0.00414589$   
 $r^2 = 0.9999805$   $r = 0.9999902$

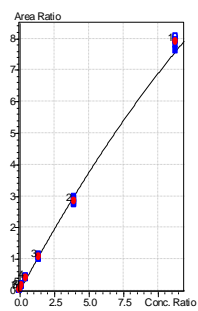
**Heksaanihappo**



$$Y = aX^2 + bX + c$$

$a = -0.0122925$   
 $b = 0.810224$   
 $c = 0.0195412$   
 $r^2 = 0.9946496$   $r = 0.9973212$

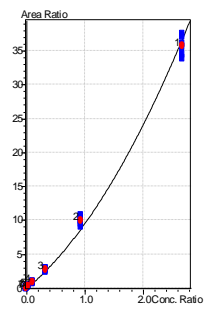
**Pentaanidihappo**



$$Y = aX^2 + bX + c$$

$a = 2.49773$   
 $b = 7.07656$   
 $c = -0.00262575$   
 $r^2 = 0.9950972$   $r = 0.9975456$

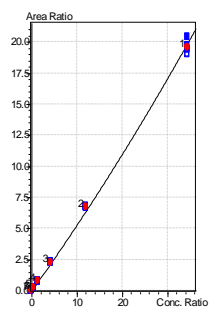
**Cis-buteenidihappo**



$$Y = aX^2 + bX + c$$

$a = 0.00198072$   
 $b = 0.509566$   
 $c = -0.00636434$   
 $r^2 = 0.9987573$   $r = 0.9993785$

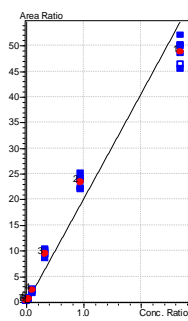
**Trans-buteenidihappo**



$$Y = aX^2 + bX + c$$

$a = 0.0679993$   
 $b = 20.2958$   
 $c = -0.0296775$   
 $r^2 = 0.9250196$   $r = 0.9617794$

**Hydroksibutaanidihappo**



## Kalibroinnin tarkkuus

kvantitatiiviset analyytit

Kalibrointitasot	Etikkahappo (C2:0)	Propanihappo (Propanoic, C3:0)	Butaanihappo (Butyric, C4:0)	2-Hydroksi-propanihappo (Lactic, C3:0-OH)	Pentaanihappo (Valeric, C5:0)	Heksaanihappo (C6:0)	Butaanidihappo (Succinic, C4:0-di)
1	104	98	100	101	100	99	100
	101	98	98	100	100	98	100
	100	105	98	99	97	100	100
	103	98	101	100	104	100	103
	103	100	100	101	99	99	99
2	102	98	103	101	103	103	97
	94	101	101	100	98	100	101
	93	99	99	99	101	99	102
	92	104	97	99	96	99	103
	95	100	100	99	101	99	104
3	93	103	99	98	97	100	102
	96	103	103	102	101	104	98
	104	99	101	100	101	100	101
	103	99	99	101	101	99	102
	102	102	98	99	97	99	103
4	104	100	103	100	103	100	103
	100	103	100	101	99	101	99
	99	102	102	101	102	105	92
	104	99	101	99	100	98	104
	102	99	100	102	101	98	101
5	99	102	96	100	95	99	101
	104	99	101	100	102	100	99
	100	99	99	102	98	101	100
	98	103	102	103	104	106	86
	102	97	100	100	102	99	109
6	104	100	98	99	100	98	103
	98	106	96	95	96	98	100
	103	102	101	98	103	99	100
	101	101	101	100	97	99	102
	102	95	101	101	103	104	87
7	101	101	100	100	103	97	107
	97	90	100	99	104	96	107
	102	100	92	98	95	96	107
	99	96	104	97	103	101	97
	102	97	105	101	97	100	96
8	98	102	103	104	101	108	86
	109	108	99	102	102	99	121
	101	92	101	111	105	100	94
	101	94	93	92	94	101	93
	98	102	101	95	99	101	88
9	88	108	101	102	97	99	106
	101	100	104	99	103	101	99

Accuracy between	90	110
Accuracy between	80	120
Out of range	<80	120<

Kalibroinnin tarkkuus

muut analyytit

Kalibrintitiasot	Muuraishappo (C1:0)	Oksotetraanihappo (Glyoxylic, C2:0-ALDO)	Hydroksieleiänihappo (Glycolic, C2:0-OH)	2-Oksopropaanihappo (Pyruvic, C3:0-KETO)	2-Metyylipropaanihappo (Isobutyric, C4:0)	3-Metyyllibutaanihappo (Isovaleric, C5:0)	Pentaanihappo (Glutaric, C5:0-dl)	Hydroksibutaanihappo (Malic, C4:0-OH-dl)	2-Oksopentaanihappo (Ketoglutaric, C5:0-KETO-dl)	Glukuronihappo (C6-uroni)
1	----	93	96	103	101	107	83	92	89	
	----	97	96	102	101	103	82	96	100	
	----	120	106	96	96	108	91	103	119	
	----	95	95	102	104	106	91	95	88	
	----	115	105	97	99	101	95	100	109	
	----	95	99	105	103	104	88	87	82	
	98	88	98	100	98	95	114	109	97	
	100	89	97	97.1	101	93	116	121	105	
	113	110	112	95.9	95	97	125	130	138	
	99	89	97	100.3	102	91	123	117	99	
2	111	101	104	97.3	94	90	130	128	117	
	109	87	103	103.1	100	101	123	101	84	
	89	100	97	102.8	104	96	133	97	92	
	93	104	99	101.2	102	101	137	108	101	
	97	128	114	99.3	98	96	152	121	138	
3	89	105	97	105.2	104	103	95	107	94	
	98	118	107	102.1	98	99	149	118	115	
	97	94	102	107.4	99	101	128	88	78	
	96	96	94	102.4	105	99	87	85	89	
	99	98	97	101.2	102	100	94	94	95	
4	105	122	113	95.3	96	95	104	103	129	
	91	98	94	102.4	103	103	95	90	87	
	104	111	105	98.2	98	97	102	101	108	
	102	86	98	106.1	100	103	74	79	76	
	99	95	96	100	103	102	63	83	90	
5	99	92	93	95	102	101	68	91	91	
	107	116	109	93.7	96	96	113	99	125	
	94	94	93	98.2	104	106	72	86	86	
	106	106	102	97.2	97	99	78	98	105	
	105	87	97	104.5	100	103	67	84	81	
	97	94	91	91.3	103	104	66	85	91	
	106	91	93	97	102	104	75	91	90	
	107	115	111	94.8	93	94	79	100	128	
	94	92	92	100.1	103	104	76	92	89	
	109	104	99	101.2	97	99	115	98	103	
6	105	74	96	103.3	100	100	68	84	80	
	90	98	100	89.1	101	101	109	104	99	
	96	95	95	100.7	101	101	128	104	99	
	105	135	116	89.7	95	96	111	112	130	
	91	98	101	103	103	102	121	100	98	
7	108	97	101	109.6	100	99	115	110	103	
	104	88	95	113.1	101	99	93	96	80	

Accuracy between	90	110
Accuracy between	80	120
Out of range	<80	120<